



UNIVERSIDADE
NOVA
DE LISBOA

**CONTRIBUIÇÃO DO EFLUXO PARA A AQUISIÇÃO
DE RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS EM
ISOLADOS CLÍNICOS DE *Acinetobacter baumannii***

ANA SOFIA MOURÃO SIMÕES

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE
MESTRE EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

Fevereiro 2016



UNIVERSIDADE
NOVA
DE LISBOA

**CONTRIBUIÇÃO DO EFLUXO PARA A AQUISIÇÃO
DE RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS EM
ISOLADOS CLÍNICOS DE *Acinetobacter baumannii***

ANA SOFIA MOURÃO SIMÕES

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE
MESTRE EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

Orientador: Professor Doutor Miguel Viveiros

Co-orientadora: Doutora Diana Machado

Trabalho experimental desenvolvido na Unidade de Ensino e Investigação em
Microbiologia Médica do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT/UNL)

Fevereiro 2016

Agradecimentos

É neste pequeno espaço que tentarei transmitir a minha enorme gratidão a todas as pessoas que, com o seu importante contributo, caminharam ao meu lado neste desafio académico:

Ao meu orientador, Professor Doutor Miguel Viveiros, Diretor do Grupo de Micobactérias da Unidade de Ensino e Investigação de Microbiologia Médica, do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, gostaria de manifestar profunda gratidão pela sua orientação, disponibilidade, pela transmissão de conhecimentos, sem esquecer as suas palavras de constante incentivo, que foram tão importantes para mim.

À minha co-orientadora, Doutora Diana Machado, um muito obrigado por todo o apoio, orientação e partilha de conhecimentos teóricos e práticos transmitidos, sem os quais não teria sido possível a realização deste trabalho.

À Professora Doutora Isabel Couto, o meu sincero agradecimento por estar sempre presente, durante todo o meu percurso académico, e pelos preciosos conselhos e ensinamentos que me transmitiu.

À Comissão Científica do Mestrado de Microbiologia Médica, agradeço por me permitirem a realização de mais uma grande etapa no meu percurso académico.

À Unidade de Ensino e Investigação em Microbiologia Médica do Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa, agradeço a disponibilização das condições laboratoriais necessárias para a realização deste trabalho. Aos meus colegas de laboratório agradeço-lhes todo o apoio, transmissão de conhecimentos e simpatia com que me brindaram ao longo destes meses.

Um agradecimento especial ao Hospital de Lisboa que forneceu o material biológico indispensável para a realização do presente trabalho; agradeço aos Médicos, enfermeiros e técnicos de laboratório por todo o seu trabalho e informações facultadas.

Ao Professor Doutor João Piedade, Coordenador da VI edição do Mestrado em Microbiologia Médica, um profundo agradecimento por toda a amizade, preocupação, rápida resolução de problemas e por estar sempre disponível para todos nós.

Aos meus queridos colegas de Mestrado, estou muito grata por vos ter conhecido e por todos os momentos especiais que partilhámos; sem vocês, esta viagem teria sido muito diferente. Aos meus amigos e colegas: Elizeth Lopes, Fábio Ferreira, Marta Nascimento e Joana Calado, estou-vos profundamente grata por terem sido os meus companheiros neste percurso. Joana, minha companheira de escrita, a minha gratidão para contigo é eterna, pela amizade, carinho e companheirismo.

À minha prima Sofia Costa, com a qual partilho um feitio muito especial: muito obrigada por estares sempre disponível para mim, pelo teu carinho e preocupação. Mónica Nunes e Teresa Carreira, estou-vos muito agradecida pela amizade e momentos de boa disposição que partilhámos. Laura Fernandes, cara colega veterinária, agradeço-te os abraços apertados e as tuas palavras amigas nos momentos mais difíceis.

À querida Vera Pereira por todo o apoio, amizade e interesse no meu trabalho. Às minhas colegas e amigas Joana Sismeiro, Marta Batista e Filipa Marcos: muito obrigada por todo o incentivo, amizade e alegria.

Às minhas queridas amigas e irmãs Raquel César e Susana Marques: não existem palavras suficientes para vos agradecer. A vossa amizade foi uma luz que iluminou todo o meu caminho. Aos meus amigos Miguel Brotas e Hugo David, agradeço-vos toda a vossa amizade, carinho e aptidão para me fazerem rir.

Aos meus queridos pais, têm a minha gratidão eterna por me apoiarem incondicionalmente nesta nova etapa da minha vida académica, por todo o amor e compreensão, inestimáveis. Ao Félix, meu companheiro incansável de sessões de escrita, pela dedicação e amor, que só um gato sabe oferecer.

A todos, muito obrigada!

Resumo

A rápida disseminação de isolados multirresistentes aos antibióticos (MDR) em *Acinetobacter baumannii* é preocupante, limitando as opções terapêuticas para o tratamento destas infecções e compõe ao desenvolvimento de alternativas terapêuticas. A atividade dos sistemas de efluxo em bactérias é reconhecida como um dos mecanismos de resistência aos antibióticos, além de que os compostos inibidores de efluxo (IEs) são considerados potenciais adjuvantes terapêuticos no tratamento das infecções causadas por bactérias MDR. Em *A. baumannii*, estão descritos sistemas de efluxo envolvidos na aquisição do fenótipo MDR, à semelhança de outras bactérias Gram-negativas. Assim sendo, este trabalho teve como objetivo principal avaliar a contribuição da atividade de efluxo para o desenvolvimento de multirresistência em isolados clínicos de *A. baumannii*. Para esse fim, estudou-se da atividade de efluxo em três isolados clínicos sequenciais MDR de *A. baumannii* (AB-1, AB-2 e AB-3), através de metodologias para avaliação do efluxo de forma i) direta, pela detecção preliminar da atividade de efluxo pelo método de “Cartwheel” em placa de agar e confirmação da atividade de efluxo pela realização de ensaios de fluorimetria em tempo real (após otimização do protocolo experimental) usando brometo de etídio como substrato de efluxo universal; e ii) indireta, pela determinação de concentrações mínimas inibitórias (CMIs) de antibióticos e brometo de etídio na presença e ausência de IEs. Os resultados permitiram concluir que os três isolados clínicos MDR possuem atividade aumentada de efluxo em relação à estirpe de referência *A. baumannii* ATCC19606^T, em particular o isolado AB-2 e também quais os IEs que melhor potenciaram a acumulação de EtBr nas células e causaram redução significativa das CMIs dos antibióticos, o que adiciona interesse ao estudo destes compostos como potenciais adjuvantes terapêuticos e sublinha a importância do efluxo como o primeiro passo na aquisição de resistência em isolados clínicos de *A. baumannii*.

Abstract

The rapidly spreading of multidrug resistant (MDR) *Acinetobacter baumannii* isolates is not only alarming, but urges the need for the development of alternative therapeutic options, by limiting the available options for the treatment of these serious infections. The activity of bacterial efflux systems is recognized as one of the mechanisms for antimicrobial resistance; furthermore, efflux inhibitors (IEs) are regarded as potential adjuvants in the treatment of MDR infections. In *A. baumannii*, there are several efflux mechanisms described, that play a role in the acquisition of MDR phenotype, in similarity to other Gram-negative bacteria. Therefore, the aim of this work was to determinate the contribution of efflux pump systems to the development of multidrug resistance in *A. baumannii* clinical isolates. Hence, we studied efflux activity in three *A. baumannii* clinical sequential isolates (AB-1, AB-2 e AB-3), by i) direct measurement of efflux using the agar “Cartwheel” method and real time fluorometry assays (after protocol optimization) using agar ethidium bromide (EtBr) as a broad efflux substrate, and ii) indirect measurement of efflux (by determining the minimal inhibitory concentrations (CMIs) of antibiotics and EtBr in the presence and absence of IEs. The results obtained allowed us to conclude that all three *A. baumannii* clinical isolates exhibit greater efflux activity, when compared to the type strain *A. baumannii* ATCC19606^T, in particular AB-2 isolate; also, we demonstrated which IEs were more efficient in triggering intracellular accumulation of EtBr and reducing significantly the MIC values for antibiotics and EtBr. This supports efflux pump’s systems as the first step towards the acquisition of multidrug resistance in clinical *A. baumannii* isolates, and raises interest in the use of IEs as therapeutic adjuvants.

Lista de símbolos e abreviaturas

ABC	Do inglês “(ATP)-Binding Cassette”
ADP	Adenosina difosfato, do inglês “adenosine diphosphate”
AK	Amicacina
AMP	Ampicilina
ATP	Adenosina trifosfato, do inglês “adenosine 5’-triphosphate”
ATPase	Adenosina trifosfatase, do inglês “adenosine triphosphatase”
BE(s)	Bomba(s) de efluxo
Ca²⁺	Ião cálcio
CAMHB	Do inglês: “cation adjusted Mueller-Hinton broth”
CAZ	Ceftazidima
CCCP	Carbonil cianeto <i>m</i> -clorofenilhidrazona
CIP	Ciprofloxacina
CLA	Claritromicina
CLSI	“Clinical and Laboratory Standards Institute”
CMI(s)	Concentração/Concentrações Mínima(s) Inibitória(s)
CN	Gentamicina
CO	Colistina
CPZ	Clorpromazina
CTX	Cefotaxima
CXM	Cefuroxima
DHFA	Ácido dihidrofólico
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês “deoxyribonucleic acid”
DO	Densidade óptica
ECDC	Do inglês “European Center for Disease Prevention and Control”
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ESKAPE	Grupo de agentes patogénicos: <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , e <i>Enterobacter</i> spp.
EtBr	Brometo de etídio, do inglês “ethidium bromide”
ERI	Eritromicina

EUCAST	Do inglês “European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing”
FEP	Cefepime
FFR	Fluorescência final relativa
FM	Fator de Modulação
FOX	Cefoxitina
FR	Fluorescência relativa
G	Glucose
G+C	guanina e citosina
H⁺	Ião hidrogénio
IE(s)	Inibidor(es) de bombas de efluxo
IMP	Imipenem
K⁺	Ião potássio
LPS	Lipopolissacárido
MATE	Do inglês “Multidrug and toxic compound extrusion”
MC	Membrana citoplasmática
MDR	Do inglês “Multidrug resistant”
ME	Membrana externa
MER	Meropenem
MFP	Do inglês “membrane fusion protein”
MFS	Do inglês “Major facilitator superfamily”
MHA	Do inglês “Mueller-Hinton agar”
MHB	Do inglês “Mueller-Hinton broth”
M.O.	Microscópio óptico
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro, do inglês “messenger ribonucleic acid”
NA	Ácido Nalidíxico
Na⁺	Ião sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NMP	“1-(1-naphthylmethyl)-piperazine”
OMF	Do inglês “outer-membrane factor”
OMP	Do inglês “outer-membrane protein”
P	Periplasma
PABA	Ácido 4-aminobenzóico

PAβN	Phe-arg β-naphthylamide dihydrochloride
PBS	Do inglês “phosphate buffered saline”
PBP	Do inglês “Penicillin-binding protein”
pH	Potencial de hidrogénio
P_i	Do inglês “inorganic phosphate”
pm	Peso molecular
QRDR	Do inglês “Quinolone resistance determining region”
RD	Rifampicina
RNA	Ácido ribonucleico, do inglês “ribonucleic acid”
RND	Do inglês “Resistance nodulation division”
rRNA	RNA ribossómico, do inglês “ribosomal ribonucleic acid”
SMR	Do inglês “Small multidrug resistance”
SXT	Trimetoprim-sulfametoxazol
TE	Tetraciclina
THFA	Ácido tetrahidrofólico
TOB	Tobramicina
tRNA	RNA transportador, do inglês “transfer ribonucleic acid”
TZ	Tioridazina
V	Volume
XDR	Do inglês “extensively drug resistant”

Unidades:

g	grama
L	litro
M	Molar
mg	miligrama
min	minuto
mL	mililitro
nm	nanómetro
µg	micrograma
µl	microlitro
°C	grau Celsius

Índice geral

Agradecimentos	i
Resumo	iii
Abstract	iv
Lista de símbolos e abreviaturas	v
Índice geral.....	viii
Índice de Figuras.....	xii
Índice de Tabelas	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Género <i>Acinetobacter</i>	1
1.1.1 <i>Acinetobacter baumannii</i>	2
1.1.1.1 Características gerais	2
1.1.1.2 Parede celular.....	3
1.1.1.3 Patogénese e virulência.....	4
1.1.1.4 Importância clínica e terapêutica	4
1.2 Agentes antimicrobianos e seus mecanismos de ação.....	7
1.3 Mecanismos de resistência aos agentes antimicrobianos	9
1.4 Sistemas de efluxo em bactérias Gram-negativas e em <i>A. baumannii</i>	12
1.4.1 Família “ATP-binding cassette” (ABC).....	13
1.4.2 “Major facilitator superfamily” (MFS)	14
1.4.3 Família “Small multidrug resistance” (SMR)	14
1.4.4 Família “Multidrug and toxic compound extrusion” (MATE).....	14
1.4.5 Família “Resistance nodulation cell division” (RND)	15
1.5 Inibidores de efluxo e mecanismos de ação	17

1.6	Métodos para a detecção da atividade de efluxo em bactérias.....	20
1.6.1	Método fluorométrico semi-automático para monitorização do transporte de EtBr em tempo real	20
1.6.2	Método de “Cartwheel” em placa de agar.....	23
1.6.3	Avaliação da atividade dos inibidores de bombas de efluxo através da determinação de concentrações mínimas inibitórias	23
1.7	A importância de <i>A. baumannii</i> como agente de infeção nosocomial e as dificuldades no seu tratamento	24
1.8	Objetivos do trabalho	26
2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	28
2.1	Material.....	28
2.1.1	Isolados em estudo	28
2.1.2	Meios de cultura, compostos e soluções.....	29
2.2	Métodos	31
2.2.1	Crescimento dos isolados em estudo.....	31
2.2.2	Determinação da suscetibilidade aos antibióticos pelo método de difusão em disco e Etest.....	31
2.2.3	Determinação de concentrações mínimas inibitórias pelo método de diluição em microplaca para os antibióticos na presença dos compostos inibidores de efluxo.....	32
2.2.4	Deteção preliminar da atividade de efluxo nos isolados em estudo pelo método de “Cartwheel” em placa de agar	34
2.2.5	Método fluorométrico semi-automático em termociclador de tempo real Rotor Gene TM 3000.....	35
2.2.5.1	Preparação dos isolados em estudo.....	36
2.2.5.2	Ensaio de acumulação de EtBr.....	36
2.2.5.3	Ensaio de acumulação de EtBr na presença de inibidores de efluxo	37
2.2.5.4	Ensaio de efluxo de EtBr na presença de inibidores de efluxo.....	38

3.	RESULTADOS	39
3.1	Caracterização fenotípica dos isolados AB-1, AB-2, AB-3 e estirpe de referência ATCC19606 ^T	39
3.1.1	Determinação do perfil de suscetibilidade aos antibióticos pelo método de difusão por disco e Etest.....	39
3.2	Deteção da atividade de efluxo nos isolados e estirpe de referência de <i>A. baumannii</i> em estudo.....	42
3.2.1	Deteção preliminar da atividade de efluxo pelo método de “Cartwheel” em placa de agar.....	42
3.2.2	Deteção da atividade de efluxo pelo método fluorométrico semi-automático em termociclador de tempo real Rotor Gene TM 3000.....	44
3.2.2.1	Avaliação da acumulação de EtBr na presença de inibidores de efluxo	48
3.2.2.2	Avaliação do efluxo de EtBr na presença de inibidores de efluxo	52
3.3	Avaliação da atividade dos inibidores de bombas de efluxo através da determinação de concentrações mínimas inibitórias	55
3.3.1	Determinação das concentrações mínimas inibitórias dos antibióticos para os isolados AB-1, AB-2, AB-3 e estirpe de referência ATCC19606 ^T	55
3.3.2	Determinação das concentrações mínimas inibitórias dos antibióticos e EtBr na presença de inibidores de efluxo para os isolados AB-1, AB-2, AB-3 e estirpe de referência ATCC19606 ^T	56
4.	DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	62
4.1	Análise do perfil de suscetibilidade aos antibióticos dos isolados clínicos AB-1, AB-2 e AB-3 e estirpe de referência ATCC19606 ^T	62
4.2	Avaliação da contribuição dos sistemas de efluxo para o desenvolvimento de fenótipos de multirresistência em isolados clínicos de <i>A. baumannii</i>	64
4.2.1	Deteção da atividade de efluxo nos isolados AB-1, AB-2, AB-3 e estirpe de referência ATCC19606 ^T	65
4.2.2	Influência dos compostos inibidores de efluxo na determinação das concentrações mínimas inibitórias dos antibióticos e EtBr.....	67

4.3	Inibidores de efluxo como potenciais adjuvantes terapêuticos no tratamento das infecções por <i>A. baumannii</i>	72
4.4	Trabalho futuro	74
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

Índice de Figuras

Figura 1 - Estirpe de referência <i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC19606 ^T (A) crescimento em meio de gelose sangue (37°C, 24 horas); (B) coloração de Gram (M.O. 1000x).....	2
Figura 2 - Representação esquemática da parede celular de bactérias Gram-negativas.....	3
Figura 3 - Representação esquemática dos principais mecanismos de ação dos antibióticos e alguns exemplos de cada classe.....	7
Figura 4 - Representação esquemática das bombas de efluxo e suas fontes de energia em bactérias Gram-negativas.....	13
Figura 5 - Representação gráfica de um ensaio de acumulação de EtBr.....	21
Figura 6 - Representação gráfica de um ensaio de efluxo de EtBr.....	22
Figura 7 - Esquema representativo do método de inoculação dos isolados em estudo nas placas utilizadas nos ensaios de “Cartwheel” em placa de agar.....	35
Figura 8 – Imagens representativas dos resultados obtidos no ensaio de "Cartwheel" em placa de agar para detecção preliminar da atividade de efluxo nos isolados e estirpe de referência em estudo	42
Figura 9 - Determinação da concentração de equilíbrio de EtBr.....	45
Figura 10 - Ensaios de acumulação de EtBr na presença de glucose a 0,4%	46
Figura 11 - Efeito dos inibidores de efluxo na acumulação de EtBr na ausência de glucose	48
Figura 12 - Efeito dos inibidores de efluxo na acumulação de EtBr na presença da glucose	49
Figura 13 - Ensaios fluorométricos de efluxo de EtBr na presença de inibidores de efluxo	52
Figura 14 - Ensaios fluorométricos de efluxo de EtBr na presença de inibidores de efluxo e glucose a 0,4%	53

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Principais mecanismos de resistência aos antibióticos em <i>A. baumannii</i>	9
Tabela 2 - Principais sistemas de bombas de efluxo em <i>A. baumannii</i> e seus principais substratos.....	16
Tabela 3 - Composição dos meios de cultura utilizados.....	29
Tabela 4 - Composição e modo de preparação de soluções.....	29
Tabela 5 - Composição e modo de preparação das soluções de inibidores de efluxo e substrato de bombas de efluxo.....	30
Tabela 6 - Composição e modo de preparação das soluções de antibióticos utilizadas.	30
Tabela 7 - Discos de antibióticos utilizados e carga do disco.....	31
Tabela 8 - Compostos e gama de concentrações utilizadas.	33
Tabela 9 - Perfil de suscetibilidade dos isolados em estudo determinado pelo método de difusão por disco.	40
Tabela 10 - Determinação da CMI para a colistina pelo método de Etest para os isolados e estirpe de referência de <i>A. baumannii</i> em estudo.....	41
Tabela 11 - Determinação de MC_{EtBr} para os três isolados e estirpe de referência ATCC19606 ^T	43
Tabela 12 - Valores da CMIs para os inibidores de bombas de efluxo e EtBr nos isolados e estirpe de referência de <i>A. baumannii</i> em estudo.....	46
Tabela 13 - Concentrações de inibidores de efluxo para os ensaios de fluorimetria em tempo real.....	47
Tabela 14 - Valores de Fluorescência Final Relativa para os inibidores de efluxo em estudo.	51
Tabela 15 – Determinação dos valores de CMIs para os antibióticos nos três isolados e estirpe de referência ATCC19606 ^T	55
Tabela 16 - Valores de CMIs para a amicacina, meropenem, claritromicina, eritromicina e EtBr na ausência e presença dos Inibidores de efluxo e Fator de Modulação.	57
Tabela 17 - Valores de CMIs para a ciprofloxacina, tetraciclina, rifampicina e colistina na ausência e presença dos Inibidores e efluxo e Fator de Modulação	58

1. INTRODUÇÃO

1.1 Género *Acinetobacter*

O género *Acinetobacter* - do grego “akinetos”, que significa sem motilidade – pertence à família *Moraxellaceae* e ordem Pseudomonadales. Este género foi oficialmente reconhecido em 1971, com base no trabalho desenvolvido por Baumann *et al.*, publicado em 1968 (1,2). É composto por bactérias Gram-negativas, sem motilidade, aeróbios estritos, oxidase-negativo e catalase-positivo, não fermentadoras de glucose e com um conteúdo G+C de 39% a 47% no seu DNA (1,3). Algumas espécies deste género são ambientais, como *Acinetobacter calcoaceticus*, enquanto outras são responsáveis por infeções em humanos e animais, como *Acinetobacter pittii*, *Acinetobacter nosocomialis* e *Acinetobacter baumannii* (1,2,4–6). Embora *A. baumannii* esteja maioritariamente envolvido nas infeções nosocomiais de humanos e animais, pode ser também encontrado na comunidade, mas com muito menos frequência (1). Este agente coloniza a pele e mucosas de humanos e animais (7–9) e já foi descrito o seu isolamento em vegetais (10), solo e águas (1,8,11,12). No entanto, permanece por esclarecer se o seu isolamento, embora pouco frequente, é resultado de contaminação ambiental pelo reservatório hospitalar ou indicativo da existência de um reservatório natural desta espécie (8,13).

O género *Acinetobacter* é atualmente composto por 46 espécies (<http://www.bacterio.net/acinetobacter.html>, acedido em Fevereiro 2016) e 18 grupos genómicos (7,14). O complexo *Acinetobacter calcoaceticus* - *Acinetobacter baumannii* é constituído por espécies geneticamente próximas e fenotipicamente idênticas: *A. calcoaceticus*, *A. pittii*, *A. nosocomialis* e *A. baumannii* (7). A espécie *A. calcoaceticus* (espécie genómica 1) possui pouca importância clínica embora tenha já sido descrito o seu envolvimento em pneumonias e bacteriemia (15,16), enquanto que *A. baumannii* (espécie genómica 2) apresenta maior importância no contexto da infeção humana e maior desenvolvimento de resistência aos antibióticos do que *A. pittii* (espécie genómica 3) (7), e maior mortalidade associada do que *A. nosocomialis* (espécie genómica 13U) (17,18).

1.1.1 *Acinetobacter baumannii*

1.1.1.1 Características gerais

A espécie *Acinetobacter baumannii* compreende bactérias Gram-negativas, não-móveis, aeróbias estritas, não fermentadoras de glucose, oxidase-negativo e catalase-positivo (1,3). *A. baumannii* apresenta crescimento em meio de cultura não seletivo após 24 a 48 horas de incubação a 37°C (7), podendo crescer em diferentes condições de temperatura, pH e disponibilidade de nutrientes (2). Em meio de gelose sangue, após incubação a 37°C durante 24 a 48 horas, *A. baumannii* apresenta colônias lisas e mucoides, não hemolíticas, com coloração amarelo pálido a cinzento (3,7,19,20) como se observa na Figura 1(A).

Microscopicamente, são observados em forma de cocos/cocobacilos com cerca de 1,5 µm de comprimento (3,19). Pelo método de coloração de Gram, é possível observar cocobacilos de coloração Gram-negativas, como se encontra exemplificado na Figura 1(B).

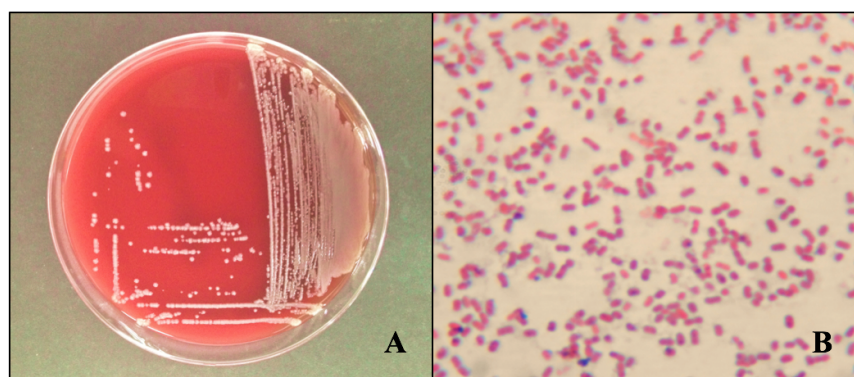


Figura 1 - Estirpe de referência *Acinetobacter baumannii* ATCC19606^T (A) crescimento em meio de gelose sangue (37°C, 24 horas); (B) coloração de Gram (M.O. 1000x). Fonte: Original da autora.

1.1.1.2 Parede celular

Em *A. baumannii*, a constituição da parede celular é idêntica à de outras bactérias Gram-negativas, como se representa na Figura 2. A camada mais interna da parede celular é constituída pela membrana citoplasmática (MC), formada por uma bicamada de fosfolípidos e intercalada por proteínas de membrana, que regula a passagem de metabolitos para dentro e fora do citoplasma. Participa também na regulação osmótica e do pH, síntese de fosfolípidos e peptidoglicano, entre outras funções. Uma fina camada de peptidoglicano envolve a MC, conferindo-lhe rigidez e estrutura, sobre o qual se encontra o periplasma (P), um espaço elástico e poroso repleto de atividade enzimática e de transporte de moléculas. A membrana externa (ME), exclusiva das bactérias Gram-negativas, constitui uma barreira adicional formada por fosfolípidos, polissacáridos e proteínas (21,22).

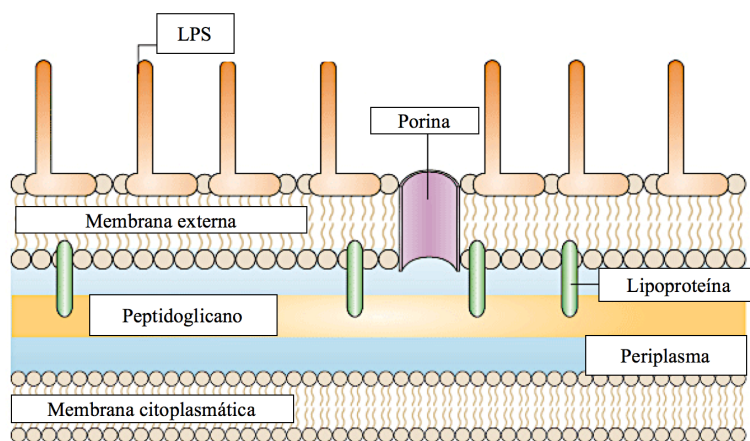


Figura 2 - Representação esquemática da parede celular de bactérias Gram-negativas.

Legenda: LPS – lipopolissacarídeo. (Adaptado de 22)

A resistência intrínseca observada em *A. baumannii* e noutras bactérias Gram-negativas deve-se em grande parte à impermeabilidade aos agentes hidrofóbicos da ME bacteriana, constituída por lipopolissacarídeo (LPS), porinas pouco permeáveis e bombas de efluxo com um largo espectro de substratos. Segundo alguns autores, a ME de *A. baumannii* contribui para a defesa contra a ação dos péptidos antimicrobianos, para a sua patogénese e resistência aos antibióticos (23).

1.1.1.3 Patogénese e virulência

Os principais fatores que contribuem para a virulência e patogenicidade de *A. baumannii* incluem a i) capacidade de sobrevivência no meio ambiente, numa grande variedade de superfícies e materiais inertes, com diferentes condições de humidade e temperatura (2,7); ii) formação de biofilmes, favorecendo a ocorrência de pneumonias associadas a ventiladores, infeções do trato urinário e de feridas cirúrgicas, entre outras (2,3,7,20) e iii) presença de proteínas de membrana externa (OMP, do inglês “Outer-membrane proteins”) (2). As OMPs têm reconhecida função na fisiologia bacteriana, como na aderência, invasão e resistência no hospedeiro, manutenção da estrutura celular, e ligação a uma grande variedade de substâncias, incluindo transporte passivo e ativo destas (24). A OMP mais abundante em *A. baumannii*, OmpA, interage com as células epiteliais do hospedeiro induzindo citotoxicidade, disfunção mitocondrial e libertação de substâncias que resultam em apoptose celular (2,25). Esta proteína está também envolvida na resistência à ação do complemento, na formação de biofilmes e na resistência aos carbapenemos (2,24).

1.1.1.4 Importância clínica e terapêutica

A. baumannii é um agente patogénico oportunista, responsável por inúmeros surtos de infeção, na sua maioria nosocomial, a nível mundial (7), sobretudo em doentes com quadro clínico de imunossupressão (2,3,7,20). Causa pneumonias associadas a ventiladores, infeções do trato urinário, bacteriemia, infeções de feridas cirúrgicas e queimaduras, endocardite, septicémia, e, mais raramente, meningite (2,3,7,20). Têm maior predisposição para desenvolver infeção por *A. baumannii* os doentes com imunossupressão que são submetidos à colocação de drenos ou cateteres, próteses (2,7), quimioterapia, cirurgias invasivas ou transplantes de órgãos (6,26,27), e geralmente expostos a terapêutica antibiótica empírica (28).

A renovada importância clínica de *A. baumannii* deve-se à emergência e rápida disseminação da resistência aos antibióticos (1,7,27), facilitada pela ocorrência de transferência horizontal de genes e à já anteriormente referida capacidade de

persistência no ambiente e formação de biofilmes (7,29,30). Os isolados clínicos multirresistentes aos antibióticos (MDR, do inglês “multidrug resistant”), que apresentam resistência adquirida a pelo menos um antibiótico pertencente a três ou mais classes de antibióticos (31), são os mais preocupantes a nível hospitalar (8).

Os carbapenemos são os antibióticos de primeira-linha no tratamento das infecções por *A. baumannii*, principalmente meropenem e imipenem (2,7,32). Outros antibióticos utilizados na terapêutica incluem outros β -lactâmicos (ex.: cefalosporinas de terceira geração), as fluoroquinolonas (ex.: ciprofloxacina), os aminoglicosídeos (ex.: gentamicina, tobramicina, ampicilina) e as tetraciclinas (ex.: tigeciclina, minociclina) (7,19,32,33).

Em 2015, o “European Centre for Disease Prevention and Control” (ECDC) reportou que em 2012, mais de 50% dos isolados de *Acinetobacter* spp. em países europeus eram resistentes a uma ou mais das seguintes classes de antibióticos: carbapenemos, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos. Os países do Sul da Europa apresentaram uma maior percentagem de resistência aos antibióticos em relação aos países do Norte da Europa (34,35). As opções terapêuticas, nestes casos, são limitadas, restringindo-se à administração de antibioterapia em combinação (36) ou ao uso de polimixinas, como último recurso (37–39).

A colistina é presentemente administrada como último recurso terapêutico contra a infecção por isolados de *A. baumannii* MDR (37,38). No entanto, apesar de a colistina apresentar atividade *in vitro* contra a maioria das estirpes de *A. baumannii* (30), foram já reportados isolados clínicos resistentes às polimixinas (30,35,37–39). Adicionalmente, os países europeus com elevada incidência de *Acinetobacter* spp. resistentes aos carbapenemos reportam também o aparecimento de resistência às polimixinas (34), o que se traduz na restrição, ainda mais severa, de alternativas terapêuticas para o tratamento destas infecções (38,40).

Foi igualmente reportado o aparecimento de heteroresistência à colistina em *A. baumannii*, caracterizada pela existência simultânea numa população bacteriana de subpopulações com diferentes perfis de suscetibilidade aos antibióticos (41–46). A presença de mecanismos fisiológicos e genéticos explica a variabilidade da população bacteriana sujeita a pressão antibiótica (28,41), pela ocorrência de alterações ao nível da parede celular com alteração da permeabilidade, bem como à sobreexpressão de bombas

de efluxo motivada pela ativação de sistemas reguladores que permitem controlar a exposição dos alvos intracelulares aos antibióticos (47,48) e que permitem a sobrevivência de uma parte da população até que surjam mutações em genes que confirmem resistência duradoura ao antibiótico (28). Nestas situações, a administração de monoterapia antibiótica levará à erradicação da população suscetível e à sobrevivência da população resistente pelo que a administração de terapêutica múltipla é mandatória para eliminar ambas as populações e prevenir a emergência da multirresistência aos antimicrobianos (39,41,45).

1.2 Agentes antimicrobianos e seus mecanismos de ação

Os agentes antimicrobianos exercem a sua atividade nas bactérias através de vários mecanismos: 1) inibição da síntese da parede celular; 2) inibição da síntese proteica; 3) inibição da síntese de ácidos nucleicos; (4) inibição competitiva de metabolitos essenciais e 5) alteração da permeabilidade da membrana celular (30,49–51) . Estes mecanismos de ação dos antibióticos estão representados na Figura 3.

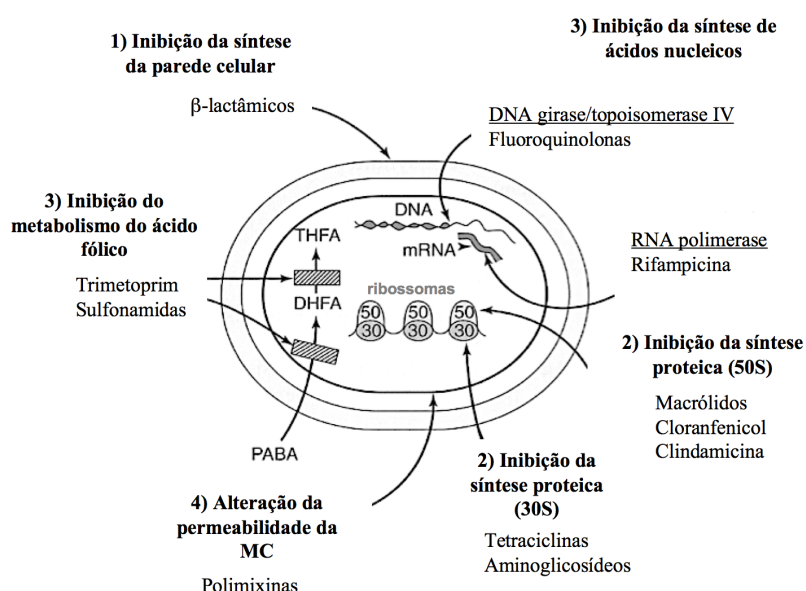


Figura 3 - Representação esquemática dos principais mecanismos de ação dos antibióticos e alguns exemplos de cada classe. Legenda: MC – membrana citoplasmática, PABA – ácido 4-aminobenzóico, DHFA – ácido dihidrofólico; THFA – ácido tetrahidrofólico. (Adaptado de 51).

Os antibióticos β-lactâmicos (ex.: penicilinas, cefalosporinas, carbapenemos) atuam por inibição da biossíntese da parede celular através da sua interação com as “penicillin-binding proteins” (PBPs), impedindo a biossíntese do peptidoglicano, causando defeitos estruturais e a ruptura da parede celular (52).

A inibição da síntese proteica pode ocorrer pela inibição da síntese de RNA ou por inibição completa da síntese proteica: os aminoglicosídeos ligam-se ao 16S rRNA na subunidade ribossômica 30S (53) e as tetraciclina inibem a síntese proteica

bacteriana ao nível da subunidade ribossômica 30S causando a interrupção da ligação do complexo tRNA-aminoácido ao ribossoma (1).

A rifampicina e as fluoroquinolonas atuam pela inibição da síntese dos ácidos nucleicos. A rifampicina inibe a transcrição ao ligar-se à subunidade β da RNA polimerase, impedindo a síntese do mRNA. As fluoroquinolonas, como a ciprofloxacina e o ácido nalidíxico, têm como alvo as enzimas DNA girase e topoisomerase IV, impedindo a replicação, transcrição, recombinação e reparação do DNA (54–56).

As sulfonamidas e o trimetoprim são inibidores competitivos e quando usados em simultâneo, inibem a síntese de DNA por inibição de dois passos sucessivos da cadeia metabólica que conduz à formação de ácido fólico, essencial para a célula bacteriana (57).

Por fim, as polimixinas (ex.: polimixina B e colistina) são antibióticos péptidos catiónicos carregados positivamente, que interagem com o lípido A do lipopolissacárido (LPS) (carga negativa), causando disrupção da membrana externa bacteriana e a perda de metabolitos essenciais para a sobrevivência da célula (35,37,39).

1.3 Mecanismos de resistência aos agentes antimicrobianos

Tal como noutras bactérias Gram-negativas, os principais mecanismos de resistência em *A. baumannii* incluem: i) alteração/modificação/eliminação do alvo do antibiótico; ii) produção de enzimas inativadoras do antibiótico (ex.: β -lactamases); iii) alterações da permeabilidade celular (ex.: alteração/diminuição da quantidade de canais de transporte de solutos - as porinas - diminuindo a entrada dos antibióticos); e iv) sobreexpressão ou expressão constitutiva de bombas de efluxo (BEs) (ex.: redução da acumulação intracelular do antibiótico) (30,58,59). Os principais mecanismos de resistência em *A. baumannii* por classe de antibiótico estão representados na Tabela 1.

Tabela 1 - Principais mecanismos de resistência aos antibióticos em *A. baumannii* (Adaptado de 49).

Classe de antibióticos	Principais mecanismos de resistência em <i>A. baumannii</i>
β -lactâmicos	(1) Produção de β -lactamases; (2) modificação de PBPs; (3) diminuição expressão/perda de OMPs; (4) efluxo
Aminoglicosídeos	(1) Enzimas modificadoras/inativadoras; (2) modificação do 16sRNA; (3) efluxo
Fluoroquinolonas	(1) Mutações nos genes <i>gyrA</i> , <i>gyrB</i> (DNA girase), <i>parC</i> e <i>parE</i> (topoisomerase IV); (2) efluxo
Tetraciclinas	(1) Proteção do alvo; (2) efluxo
Rifampicina	(1) Mutação do gene <i>rpoB</i> (2) efluxo
Sulfamidas e trimetoprim	(1) Produção de variantes das enzimas alvo
Polimixinas	Modificação do alvo (lípidos A do LPS); perda do LPS; perda de porinas

Em *A. baumannii*, o desenvolvimento de resistência aos antibióticos deve-se não só à sua capacidade de sobrevivência no hospedeiro humano e meio ambiente, o que facilita a aquisição horizontal de elementos genéticos móveis (ex.: plasmídeos, integrões, transposões) mas também à sua capacidade de sobrevivência e adaptabilidade à pressão antibiótica quando infeta o hospedeiro humano, através da associação de

mecanismos de resistência intrínseca: impermeabilidade celular e a sobreexpressão ou expressão constitutiva de BE (30,49,59,60). Do mesmo modo, tal como anteriormente referido, os canais de transporte, as porinas, contribuem para o desenvolvimento da resistência, através de variações na sua estrutura ou regulação da expressão, em resposta à presença dos antibióticos (60).

A produção de β -lactamases de origem cromossômica ou adquirida através de elementos genéticos móveis confere resistência aos β -lactâmicos em *A. baumannii*, como por exemplo penicilinas, ampicilina, cefalosporinas e carbapenemos (1,49). Outros mecanismos de resistência aos β -lactâmicos descritos em *A. baumannii* incluem a modificação das PBPs, a sobreexpressão de bombas de efluxo (20,49,61) e a diminuição da expressão ou perda de OMP, como a CarO, que confere resistência ao imipenem e meropenem (62).

Tal como noutras bactérias Gram-negativas, a resistência aos aminoglicosídeos em *A. baumannii* ocorre pela produção de enzimas modificadoras destes antibióticos, como acetiltransferases, nucleotidiltransferases e fosfotransferases (1,53). Outros mecanismos são o efluxo ativo destes antibióticos (1,61,63) e a metilação do 16S rRNA que impede a ligação do antibiótico e confere resistência de alto nível a todos aminoglicosídeos com relevância clínica, como por exemplo a gentamicina, tobramicina e amicacina (53,64,65).

O principal mecanismo de resistência às fluoroquinolonas em *A. baumannii* deve-se à presença de mutações, sobretudo na região QRDR (do inglês “quinolone resistance determining region”), em genes que codificam para as subunidades que constituem estas duas enzimas: *gyrA* e *gyrB* (DNA girase) e *parC* e *parE* (topoisomerase IV) (54,56). Adicionalmente, a sobreexpressão de bombas de efluxo pode contribuir para o desenvolvimento de resistência a estes agentes (20,61).

A resistência à ação das tetraciclinas em *A. baumannii* ocorre através da proteção ribossomal, mediada pelos genes *tet(M)* e *tet(O)* e o efluxo, mediada pelos genes *tet(A)* e *tet(B)* (1,60,61).

A resistência ao trimetoprim e sulfametoxazol ocorre principalmente pela modificação do alvo através da presença de genes que codificam para variantes alternativas das enzimas alvo destes antibióticos (57).

A resistência à rifampicina em *A. baumannii* ocorre por mutações no gene *rpoB* (que codifica para a subunidade β da RNA polimerase), o que impede a ligação deste antibiótico ao alvo (66). Adicionalmente, pode ocorrer por alterações da permeabilidade da ME (67) e efluxo ativo deste agente (1,61).

Por fim, a resistência à colistina, embora ainda pouco reportada, tornou-se emergente em *A. baumannii* (38,39). Os mecanismos mais comuns de resistência à colistina em *A. baumannii* são a perda do LPS (68), pela presença de mutações ou elementos de inserção nos genes que codificam o lípido A, inativando a sua biossíntese (37,40,69). Desta forma, a diminuição da carga negativa da membrana bacteriana diminui a capacidade de ligação da colistina, que tem carga positiva (39,44). Outros possíveis mecanismos incluem a inativação enzimática do antibiótico e efluxo (70). Até à data, apenas um número muito reduzido de registos na literatura reportam fenómenos de efluxo associados à resistência à colistina em *A. baumannii*, sendo ainda um assunto controverso (71,72).

1.4 Sistemas de efluxo em bactérias Gram-negativas e em *A. baumannii*

As bombas de efluxo são proteínas da membrana que têm como função proteger as células de efeitos tóxicos, facilitando a saída de moléculas nocivas para o espaço extracelular (60,73). Não só contribuem para o efluxo dos antibióticos, mas para a extrusão de compostos químicos, indicando que estas contribuem para a sobrevivência da bactéria no seu nicho ecológico (74).

A resistência aos antibióticos mediada por efluxo é hoje reconhecida como um importante mecanismo de resistência em bactérias (20,60,73). As BEs apresentam uma variada especificidade de substratos, sendo que as bombas de efluxo de largo espectro têm a capacidade de expulsar mais de uma classe de antibióticos ou outros compostos antimicrobianos (73,75). A sobreexpressão destas BEs, capazes de expelir antibióticos de diferentes classes, contribui para o desenvolvimento do fenótipo de multirresistência aos antibióticos, designado por “multidrug resistance” (MDR) em *A. baumannii* (73,75–78). Em *A. baumannii*, estes sistemas de efluxo são codificados no cromossoma e podem ser intrínsecos ou adquiridos (20,79,80).

A sobreexpressão e a expressão constitutiva de BEs em bactérias podem representar o primeiro passo na aquisição de resistência aos antibióticos (61,79,81). Ao diminuir a concentração intracelular destes fármacos, é permitida a sobrevivência da célula bacteriana, durante um período de tempo geracional suficiente para a aquisição de outros mecanismos de resistência, como são exemplo as mutações em genes que codificam para os alvos dos antibióticos (82,83).

Este modelo de evolução da resistência, conhecido como “arrow of time” foi proposto em algumas bactérias, como *Streptococcus pneumoniae* (83) ou em micobactérias (83,84). Adicionalmente, a sobreexpressão ou expressão constitutiva de BEs podem conferir resistência cruzada a vários antibióticos de classes diferentes, outros agentes terapêuticos não antibióticos (85), antissépticos, biocidas e desinfetantes (61,86,87), como a clorohexidina (88).

Em bactérias Gram-negativas, os sistemas de efluxo podem agrupar-se em cinco grupos de acordo a sua relação estrutural, funcional e relação filogenética: i) superfamília “ATP-binding cassette” (ABC), transportadores primários cuja fonte de

energia é a hidrólise de ATP (86); ii) família “Small multidrug resistance” (SMR); iii) família “Multidrug and toxic compound extrusion” (MATE); iv) “Major facilitator superfamily” (MFS) e v) família “Resistance nodulation cell division” (RND), que são transportadores secundários, usando o gradiente iônico como fonte de energia (20,61,89).

Na Figura 4 estão representados os sistemas de efluxo em bactérias Gram-negativas e as respectivas fontes de energia necessárias para o transporte ativo de moléculas: prótons hidrogénio (H^+) (RND, MFS e SMR), sódio (Na^+) (MATE) ou pela hidrólise de ATP (ABC) (20,89).

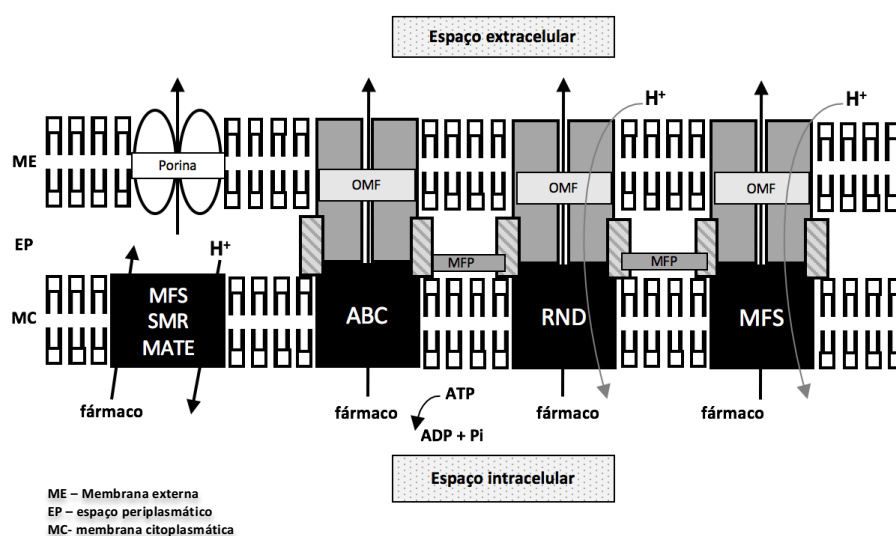


Figura 4 - Representação esquemática das bombas de efluxo e suas fontes de energia em bactérias Gram-negativas (Adaptado de 140).

1.4.1 Família “ATP-binding cassette” (ABC)

A superfamília ABC engloba BE cuja fonte de energia resulta da hidrólise de ATP, para transporte de açúcares, aminoácidos, iões, fármacos, polissacáridos e proteínas. Estes transportadores são raramente encontrados em bactérias (47,90).

1.4.2 “Major facilitator superfamily” (MFS)

A família MFS está envolvida no transporte de açúcares, metabolitos, aniões e fármacos. Estas BEs participam no efluxo de antibióticos como tetraciclina e macrólidos (47). A BE AmvA confere resistência a corantes, detergentes e eritromicina (61,63). A sobreexpressão do gene *amvA* foi detectada em isolados clínicos de *A. baumannii* com aumento da resistência aos antibióticos (61,91). Além desta BE, em *A. baumannii* estão descritas várias bombas de efluxo Tet, que conferem resistência às tetraciclina: TetA (tetraciclina) e TetB (tetraciclina e minociclina) são as mais prevalentes (60,61).

1.4.3 Família “Small multidrug resistance” (SMR)

A família SMR utiliza a força protônica como fonte de energia. Exemplos destas BEs são a QacE, confere resistência a compostos de amônio quaternário (61) e a AbeS, que confere resistência de baixo nível ao cloranfenicol, fluoroquinolonas, eritromicina, detergentes e corantes em *A. baumannii* (20,61).

1.4.4 Família “Multidrug and toxic compound extrusion” (MATE)

Os membros da família MATE utilizam o gradiente de Na^+ como fonte de energia para o efluxo de corantes e antibióticos (47). A bomba de efluxo AbeM participa no efluxo de aminoglicosídeos, fluoroquinolonas (norfloxacina, ofloxacina) gentamicina, brometo de etídio (EtBr), eritromicina, cloranfenicol e trimetoprim (60,61). A sobreexpressão do gene *abeM* foi descrita em isolados clínicos sem relação com a resistência aos antibióticos, o que sugere que esta BE tenha pouca contribuição para o desenvolvimento da resistência em *A. baumannii* (61).

1.4.5 Família “Resistance nodulation cell division” (RND)

Os sistemas de efluxo da superfamília RND possuem uma grande variedade de substratos e são compostos por três componentes: uma proteína de membrana interna (bomba RND), uma proteína periplasmática (MFP, do inglês “Membrane fusion protein”) e um canal de ligação ao exterior designado por fator de membrana externa (OMF, do inglês “Outer membrane factor”) (20,61,92).

São os sistemas de efluxo mais abundantes e bem caracterizados em *A. baumannii* bem como noutras bactérias Gram-negativas (74), devido à sua importância clínica e contribuição para a resistência intrínseca (20,61). Em *A. baumannii* estão descritos três sistemas de efluxo RND: AdeABC e AdeFGH (resistência adquirida) e AdeIJK (resistência intrínseca) (20,92).

O sistema de efluxo AdeABC (do inglês “*Acinetobacter* drug efflux”) foi o primeiro a ser caracterizado em *A. baumannii* (61,80,92,93). É composto por três componentes codificados pelo operão *adeABC*: a proteína periplasmática AdeA, transportador AdeB e o fator de membrana externa AdeC. A sobreexpressão do sistema de efluxo AdeABC contribui para a resistência adquirida e para o fenótipo MDR em *A. baumannii* (61,74,92). Os seus substratos de eleição incluem os aminoglicosídeos, β -lactâmicos (sobretudo cefepime e cefotaxime), fluoroquinolonas, tetraciclina, tigeciclina (1), macrólidos (eritromicina), cloranfenicol, trimetoprim, carbapenemos e ainda compostos quaternários como o EtBr (60,61,78), biocidas, detergentes, antissépticos e corantes (61,94).

O sistema de efluxo AdeIJK, codificado pelo operão *adeIJK*, é específico de *A. baumannii* (61). Contribui para a resistência intrínseca aos β -lactâmicos (cefalosporinas), fluoroquinolonas, tetraciclina, eritromicina, tigeciclina, lincosamidas, rifampicina, cloranfenicol, trimetoprim-sulfametoxazol e ácido fusídico (61,95), biocidas, detergentes, antissépticos e corantes (61,94,95).

Por fim, o sistema de efluxo AdeFGH, codificado pelo operão *adeFGH*, contribui para a resistência adquirida e tem como substratos preferenciais as fluoroquinolonas, cloranfenicol, trimetoprim e clindamicina, tetraciclina, tigeciclina e sulfametoxazol (20,61) e ainda detergentes, corantes e EtBr (61).

Os principais sistemas de efluxo em *A. baumannii* que contribuem para o desenvolvimento da resistência aos antibióticos e seus substratos, acima descritos, estão sumarizados e apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Principais sistemas de bombas de efluxo em *A. baumannii* e seus principais substratos.

(Super) Família	Bomba de efluxo	Substratos											
		β -lactâmicos	Aminoglicosídeos	Fluoroquinolonas	Tetraciclina	Rifampicina	Polimixinas	Macrólidos	Lincosamidas	Cloranfenicol	Trimetoprim-sulfametoxazol	Biocidas /corantes	EtBr
RND	AdeABC ¹	+	+	+	+			+		+	+	+	+
	AdeDE ²	+	+	+	+	+		+		+			+
	AdeFGH ³			+	+						+		+
	AdelJK ⁴	+		+	+	+		+	+	+	+	+	
MFS	AmvA ⁵							+				+	
	TetA ⁶				+								
	TetB ⁷				+								
	CmlA ⁸	+	+	+	+	+				+			
MATE	ABeM ⁹		+	+	+			+		+	+		+
SMR	ABeS ¹⁰			+				+		+		+	

Fontes: ¹ (1,78,96); ² (61,97); ^{3, 10} (20,61,95); ⁴ (61,95,96) ⁵ (61,96); ^{6, 7, 8, 9} (60,61).

1.5 Inibidores de efluxo e mecanismos de ação

Os inibidores de efluxo (IEs) são compostos com potencial terapêutico que inibem a atividade das BE através de vários mecanismos (20,75). Os IEs têm a capacidade de reverter o fenótipo de resistência a um ou mais antibióticos aos quais as bactérias são inicialmente resistentes. A utilização terapêutica destes compostos poderá amplificar as opções terapêuticas dos antibióticos para o tratamento das infecções por estirpes MDR de *A. baumannii* (20,75,77).

A inibição da atividade de sistemas de efluxo em bactérias Gram-negativas pode ocorrer por i) alteração da regulação da expressão de BE; ii) inibição de um dos componentes funcionais da BE; iii) bloqueio do canal da membrana externa; iv) inibição direta/indireta da fonte de energia da BE; v) inibição competitiva ou não, por compostos não-antibióticos com afinidade para locais da BE e vi) alteração da estrutura química dos antibióticos para reduzir a sua afinidade para o local de ligação (20,98). Em alguns casos, os IEs têm a capacidade de reverter a resistência para um fenótipo de suscetibilidade para um ou mais antibióticos aos quais a bactéria era inicialmente resistente (20,75,77).

Após revisão bibliográfica foram selecionados seis IEs para este trabalho, com base na demonstração da sua atividade inibitória de efluxo em *A. baumannii* ou noutras bactérias Gram-negativas, como *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. Os IEs selecionados foram: i) “Phenylalanine-arginine β -naphthylamide” (PA β N); ii) “Carbonyl cyanide-m-chlorophenylhydrazone” (CCCP) iii) Verapamil (VP); iv) “1-(1-naphthylmethyl) -piperazine” (NMP); v) Clorpromazina (CPZ) e vi) Tioridazina (TZ).

O PA β N é um composto péptido-mimético, considerado um IE de largo espectro (20,89), sendo muito utilizado em ensaios para avaliação da atividade de efluxo em bactérias (99). O mecanismo inibitório proposto consiste no seu papel como inibidor competitivo, sendo reconhecido pelas BEs como substrato competitivo em vez dos antibióticos alvo do efluxo (89,99). Desta forma, o PA β N é expelido preferencialmente para o exterior da célula pelas BEs, o que promove a acumulação e aumento da concentração intracelular do antibiótico. O efeito competitivo do PA β N varia consoante o antibiótico e a BE em questão (89). Adicionalmente, o PA β N tem a capacidade de permeabilizar a membrana celular, mesmo em baixas concentrações (100) e a sua

toxicidade é um entrave para a sua aplicação terapêutica (99). Em *Pseudomonas aeruginosa*, este IE demonstrou a capacidade de reverter a resistência e diminuir as concentrações mínimas inibitórias (CMIs) para os macrólidos (99), β -lactâmicos, tetraciclina, cloranfenicol (20,100) e fluoroquinolonas (100). Em *A. baumannii*, o PA β N demonstrou reduzir as CMIs do trimetoprim, cloranfenicol em especial da clindamicina (101). Este IE é muito utilizado em ensaios para avaliar a atividade de efluxo e o seu efeito sobre os antibióticos em várias bactérias (99).

O CCCP é um desacoplador energético que interfere com o gradiente eletroquímico da membrana bacteriana, inibindo as BE que utilizam a força protônica como fonte de energia (RND, MATE, MFS e SMR) (20,99). À semelhança de outros compostos que afetam a célula a um nível energético, o CCCP interfere com a viabilidade membranar bacteriana (99). É também extremamente tóxico quer para células bacterianas quer para as células eucariotas (86). Em *A. baumannii*, a utilização de CCCP diminui consideravelmente a CMI para as fluoroquinolonas, cloranfenicol, gentamicina, amicacina, ceftazidima e imipenem (20).

O VP é um inibidor de efluxo que possui atividade em células eucariotas e procariotas, que atua pela inibição do transporte de iões potássio (K^+) e também cálcio (Ca^{2+}), limitando o acesso e a função das ATPases dependentes de iões de cálcio (20,82,99). Este inibidor de efluxo é utilizado nas bombas de efluxo MDR em células tumorais e parasitárias (99). Embora tenham a capacidade de inibir os transportadores ABC, envolvidos no efluxo de antibióticos, as concentrações requeridas para este efeito são neurotóxicas (99). O seu efeito em bactérias Gram-negativas ainda não se encontra bem estabelecido (102), mas tem demonstrado excelentes efeitos na inibição do efluxo em bactérias Gram-positivas (99) e micobactérias (102,103).

O NMP é uma arilpiperazina derivada dos ligandos dos receptores de serotonina, um importante neurotransmissor (76,104). O seu mecanismo de ação ainda não está esclarecido (77,99), mas é possível que atue por inibição competitiva, como o PA β N (77) e sugere-se a existência de mecanismos de ação alternativos ou adicionais, pois é pouco eficaz na acumulação intracelular de substratos das BEs (99). Embora o PA β N seja mais eficiente na redução de CMIs quando utilizado em baixas concentrações, o NMP é mais eficaz quando utilizado em concentrações elevadas (77). Este IE tem a capacidade de reverter parcialmente a multirresistência em *A. baumannii* (20,99) e

aumentar a concentração intracelular de EtBr (105). A sua utilização terapêutica em humanos e animais é pouco provável, devido a ser um agonista da serotonina (99).

As fenotiazinas são utilizadas na terapêutica como agentes anti-psicóticos ou anti-histamínicos (106). A CPZ e TZ são as fenotiazinas mais estudadas, com reconhecida atividade antimicrobiana (107,108). Sugere-se que as fenotiazinas inibam a atividade das bombas de efluxo dependentes do gradiente protónico, por interação direta com as BEs (106) ou por bloqueio dos canais de cálcio, impedindo a hidrólise de ATP (109). Deste modo, as fenotiazinas inibem a fonte energética das BEs e consequentemente o efluxo de compostos tóxicos da célula bacteriana, como os antibióticos e biocidas (102,110).

1.6 Métodos para a detecção da atividade de efluxo em bactérias

Com a contribuição do efluxo para a disseminação de isolados clínicos MDR tornou-se necessário o desenvolvimento de metodologias para sua detecção e caracterização do efluxo em bactérias (75,111).

Existem vários métodos para a detecção da atividade de efluxo em bactérias (73). Esta pode ser inferida indiretamente através da determinação das CMIs para diferentes substratos na presença dos IEs (73,112). O método de “Cartwheel” e os ensaios fluorométricos em tempo real são úteis para aferição direta da atividade de efluxo em bactérias. Através do método de “Cartwheel” em placa de agar é possível detetar de forma grosseira uma atividade de efluxo aumentada em isolados clínicos (112,113). Os ensaios fluorométricos possibilitam a confirmação destes resultados através da monitorização fina do efluxo de EtBr em tempo real nos isolados em estudo (73,113) e também uma avaliação preliminar do efeito inibitório dos IEs (75). Estes dois métodos utilizam o EtBr como substrato de bombas de efluxo (73,75) O EtBr emite um sinal de fluorescência forte no interior das células ao captar electrões das proteínas e ácidos nucleicos aí existentes, e um sinal fraco quando efluxado pelas bactérias Gram-negativas para o espaço extracelular. Assim, é possível diferenciar onde se localiza este composto se usado a concentrações baixas e de equilíbrio, que não interfiram com a viabilidade celular penetrando no citoplasma da bactéria, indo intercalar-se com o seu cromossoma e afetando a replicação celular (111,112,114). Quanto maior for a fluorescência emitida, maior será a concentração intracelular de EtBr, e vice-versa (114).

1.6.1 Método fluorométrico semi-automático para monitorização do transporte de EtBr em tempo real

O método fluorométrico semi-automático permite analisar a entrada e extrusão de EtBr em tempo real através da utilização do termociclador em tempo-real Rotor-Gene 3000TM (111,113,114).

Neste trabalho, foi utilizado o protocolo de fluorimetria em tempo real desenvolvido e implementado na Unidade de Microbiologia Médica do IHMT (114,115). Para a realização deste ensaio são necessárias as seguintes condições para cada isolado em estudo: i) determinar a concentração EtBr na qual o isolado apresenta uma acumulação de EtBr basal que resulta do equilíbrio entre a entrada por difusão passiva e saída por efluxo ativo (este valor não deve ultrapassar os 10-15% de fluorescência máxima no intervalo de tempo definido); ii) definir a concentração de IE a testar para que não afete a viabilidade celular (todos os compostos foram utilizados em concentrações sub-inibitórias) e iii) garantir que o EtBr, a glucose e o IE não afetam a viabilidade celular.

Num ensaio de acumulação de EtBr é observada a capacidade de acumulação deste composto no interior da célula: quanto maior for a sua acumulação intracelular, menor será a capacidade de efluxo. Na presença de um IE verifica-se uma maior acumulação de EtBr “intracelular” devido ao bloqueio da atividade de efluxo. A diferença entre estes dois valores de fluorescência (Δ) corresponde à capacidade do IE de inibir o efluxo de EtBr, uma vez que a concentração deste composto reflete a capacidade de extrusão celular, como representado na Figura 5.

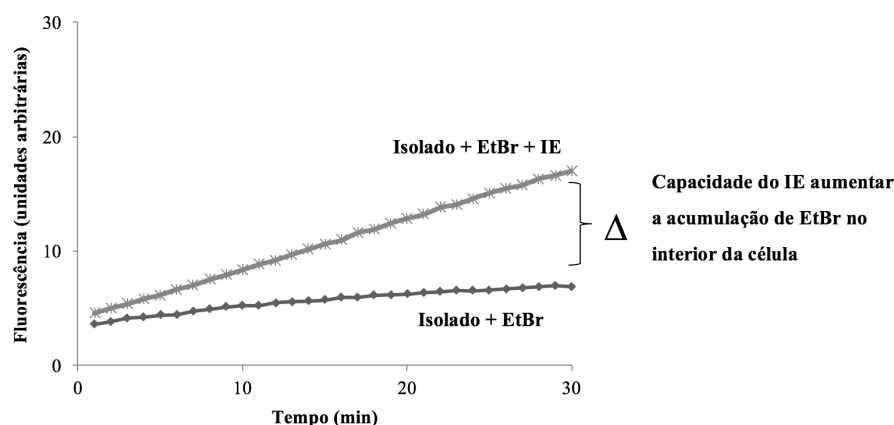


Figura 5 - Representação gráfica de um ensaio de acumulação de EtBr.

A diferença de fluorescência entre as duas curvas (curva negra –isolado apenas com adição de EtBr; curva cinza – isolado com adição de EtBr e IE) indica a acumulação de EtBr ao longo do tempo, que ocorreu devido à ação do IE, permitindo

analisar e comparar a capacidade inibitória do composto em estudo. Para cada inibidor determinou-se um coeficiente relativo de inibição designado por fluorescência final relativa (FFR), para permitir a comparação entre os vários IEs. Nesta fórmula, a fluorescência relativa no último ponto do gráfico de acumulação na presença do IE é comparada com a fluorescência relativa no último ponto da mesma curva na ausência do IE, obtendo-se um índice de inibição relativo e normalizado para cada inibidor, como se apresenta no ponto 2.2.5.3 (Material e Métodos).

Para comprovar os resultados obtidos nos ensaios de acumulação, realizaram-se ensaios de efluxo que usam os mesmos princípios metodológicos, mas que permitem uma melhor visualização gráfica do efluxo e da sua inibição. Nestes ensaios é possível observar em tempo real a extrusão de EtBr para o meio extracelular, como esquematizado na Figura 6.

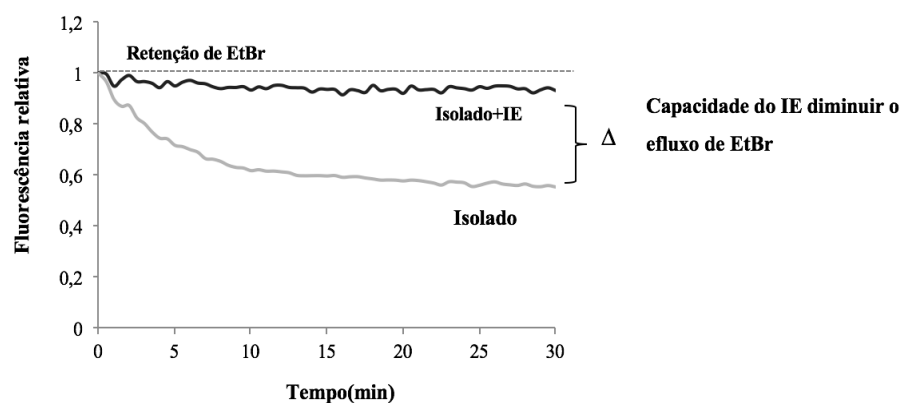


Figura 6 - Representação gráfica de um ensaio de efluxo de EtBr.

Nos ensaios de efluxo, observa-se a capacidade de efluxo de EtBr para o exterior da célula. Quando mais acentuada for a curva em cinza (isolado sem IE) maior será o efluxo de EtBr, e maior será a capacidade do IE de proporcionar a retenção intracelular deste composto, ou seja, maior será o seu efeito inibitório.

1.6.2 Método de “Cartwheel” em placa de agar

O método de “Cartwheel” foi igualmente desenvolvido da Unidade de Microbiologia do IHMT (111,116). É um método rápido que permite a detecção da sobreexpressão de sistemas de efluxo em isolados clínicos MDR com base na fluorescência emitida por cada isolado em placas com meio sólido contendo EtBr (75,111). Cada placa possui uma concentração diferente de EtBr e inclui pelo menos uma estirpe de referência. O efeito da temperatura na atividade de efluxo pode também ser avaliado, através de diferentes temperaturas de incubação. A concentração mais baixa capaz de produzir fluorescência é registrada para cada isolado (75,111). Os isolados que apresentam fluorescência a concentrações mais baixas de EtBr têm possivelmente menor atividade de efluxo do que os isolados cuja fluorescência só é detectada em concentrações mais elevadas de EtBr. Desta forma, a concentração de EtBr capaz de emitir fluorescência num isolado com sobreexpressão de bombas de efluxo é consideravelmente superior à concentração que produz fluorescência na estirpe de referência (111).

1.6.3 Avaliação da atividade dos inibidores de bombas de efluxo através da determinação de concentrações mínimas inibitórias

O efeito inibitório dos IEs pode ser inferido pela determinação da concentração mínima inibitória (CMI) para diferentes substratos na presença de IEs (73,112). A determinação dos valores de CMI pelo método de diluição seriada em microplaca para os diferentes antibióticos na presença de IEs possibilita o cálculo do Fator de Modulação (FM) (103,117). Este permite quantificar o efeito dos IEs na CMI dos antibióticos e de substratos de efluxo como o EtBr. O valor do FM reflete a redução do valor da CMI de um dado antibiótico na presença de um IE e é proporcional à “força inibitória” do inibidor (103,117). A fórmula para o cálculo do FM encontra-se no ponto 2.2.3 (Material e métodos).

1.7 A importância de *A. baumannii* como agente de infecção nosocomial e as dificuldades no seu tratamento

Adicionalmente, *A. baumannii* insere-se no grupo dos agentes patogênicos classificados como particularmente preocupantes, designados por “ESKAPE” (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Enterobacter* spp), que, para além de “escaparem” ao tratamento por antibióticos atualmente utilizados na terapêutica clínica, também são os responsáveis por uma grande parte das infecções nosocomiais (26,27,118).

Existem vários fatores de risco que favorecem a colonização e a infecção por *A. baumannii*, como a supressão do sistema imunitário do hospedeiro, procedimentos cirúrgicos invasivos como a cateterização, transplantação e cirurgias (2,3,7,20), e a pressão antibiótica e biocida (28,88,119). A combinação destes fatores promove e conduz à aquisição destas infecções em ambiente hospitalar, que, devido à dificuldade de erradicação, são sujeitas a uma maior pressão terapêutica e como consequência, à aquisição gradual de multirresistência (119). A ocorrência de infecções hospitalares por *A. baumannii* multirresistente, em particular septicémias, traduz-se numa das mais elevadas taxas de mortalidade por agentes nosocomiais, que, no caso de existir resistência aos carbapenemos, pode chegar aos 70-80% (29).

Assim sendo, para a redução da elevada morbilidade e mortalidade associadas a estas infecções, torna-se crucial a administração precoce de uma terapêutica antimicrobiana adequada, com agentes que possuam atividade *in vitro* (8,29,33,120). Para além disso, a administração de terapêutica antimicrobiana inadequada aumenta substancialmente não só um mau prognóstico para o doente, como acarreta o risco de um desenvolvimento gradual de multirresistência, devido à consecutiva administração empírica de antibioterapia (29). É, portanto, essencial identificar precocemente o perfil de resistência aos antibióticos aos quais os isolados MDR ainda são susceptíveis, e, possivelmente, a existência de adjuvantes químicos que diminuam a resistência à ação desses fármacos (86,99,106,121). Para atingir este objetivo é necessário fazer uma análise genotípica e fenotípica dos isolados clínicos MDR através de métodos rápidos e fiáveis, que permitam avaliar a suscetibilidade de *A. baumannii* aos antibióticos (1,32).

Também, estes métodos permitem determinar qual o tratamento mais adequado, as combinações terapêuticas e as dosagens necessárias para atingir o sucesso terapêutico e melhorar o prognóstico do doente (29,71).

1.8 Objetivos do trabalho

É hoje reconhecida a contribuição da atividade dos sistemas de efluxo para a resistência aos antibióticos em bactérias Gram-negativas, pela diminuição da acumulação intracelular destes fármacos. Em *A. baumannii* estão descritos vários sistemas de efluxo, semelhantes aos de outras bactérias Gram-negativas, envolvidos no desenvolvimento da resistência e fenótipo MDR de isolados clínicos (30,49,59–61,64,94). Também, os compostos IEs são considerados como potenciais alternativas terapêuticas ou adjuvantes da antibioterapia já existente, no tratamento das infeções por isolados clínicos MDR (121,122); do mesmo modo, poderão ter a capacidade de reverter o fenótipo MDR destes mesmos isolados ou permitir a administração de antibióticos já em desuso (20,89,99,106,123).

Neste trabalho, pretendeu-se avaliar se a atividade dos sistemas de efluxo em isolados clínicos MDR de *A. baumannii* contribui para o fenótipo de multirresistência aos antibióticos. Para tal, estudaram-se três isolados clínicos MDR sequenciais de *A. baumannii*, provenientes de um mesmo doente com perfil de aquisição gradual de resistência, em particular à colistina, internado num hospital em Lisboa. Assim sendo, como objetivos deste trabalho, propõe-se:

- **Confirmar o fenótipo MDR dos isolados de *A. baumannii* em estudo,** através de métodos fenotípicos para a determinação da suscetibilidade aos antibióticos (difusão por disco, Etest e determinação de concentrações mínimas inibitórias pelo método de microdiluição em placa);
- **Detetar e confirmar a presença de atividade aumentada de efluxo nos isolados clínicos sequenciais de *A. baumannii* para avaliação direta da atividade de efluxo,**
 1. Pela aplicação do método de “Cartwheel” nos isolados em estudo, para uma deteção preliminar da atividade aumentada de efluxo;
 2. Pela confirmação da atividade de efluxo detetada nos isolados de *A. baumannii*, através da otimização dos ensaios de fluorometria

em tempo real, monitorizando a entrada e saída de EtBr, substrato universal de bombas de efluxo, das células bacterianas;

- **Estudar a influência dos IEs na suscetibilidade aos antibióticos dos isolados clínicos de *A. baumannii***, à semelhança do que ocorre noutras bactérias Gram-negativas, através da utilização de compostos IEs com reconhecida atividade inibitória em *A. baumannii* e discriminando quais os antibióticos mais sujeitos ao efluxo nestes isolados, pelo método de determinação de concentrações mínimas inibitórias na presença e ausência destes inibidores;
- **Avaliar a contribuição da atividade de efluxo para a aquisição do fenótipo M/XDR em *A. baumannii***, pela análise da informação obtida sobre a atividade de efluxo nos isolados clínicos MDR em estudo, através da avaliação direta do efluxo - ensaios de “Cartwheel”, fluorometria em tempo real - em conjunto os resultados obtidos nas metodologias mais comuns que são utilizadas na avaliação indireta do efluxo em *A. baumannii* - determinação de concentrações mínimas inibitórias dos antibióticos na presença/ausência de compostos IEs;
- **Discutir a utilização dos compostos IEs como potenciais adjuvantes terapêuticos** nas infeções por isolados M/XDR de *A. baumannii*, devido ao seu efeito inibitório observado nas concentrações mínimas inibitórias em bactérias Gram-negativas e analisando as vantagens e desvantagens inerentes à sua introdução na prática clínica.

A realização de ensaios fluorométricos de acumulação e efluxo de EtBr, na presença dos inibidores, em conjunto com a determinação de CMIs antes e após adição dos antibióticos na presença destes compostos, irá providenciar prova da contribuição do efluxo ativo para o fenótipo MDR, bem como permitirá em *A. baumannii*, e permitir avaliar quais os antibióticos mais sujeitos a efluxo nestes isolados, e como os IEs podem proporcionar a diminuição da resistência. Este conjunto de ensaios de metodologias permitiram também avaliar o efeito inibitório destes compostos no efluxo em *A. baumannii*, e, desta forma, traduzindo-se no seu potencial terapêutico como adjuvantes no tratamento destas infeções.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

2.1.1 Isolados em estudo

Os três isolados sequenciais de *A. baumannii* caracterizados neste estudo foram isolados e identificados num hospital da região de Lisboa e enviados para o Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT) em gelose Columbia suplementado com 5% de sangue de carneiro (COS) (bioMérieux®, Marcy-l'Etoile, France), onde foram conservados a -80°C em Mueller-Hinton broth (suplementado com 10% de glicerol). A denominação atribuída aos três isolados clínicos em estudo deve-se à ordem cronológica do seu isolamento clínico, no mesmo doente: AB-1, AB2 e AB-3.

Os três isolados clínicos de *A. baumannii* em estudo, designados por AB-1, AB-2 e AB-3, são provenientes de amostras de aspirado brônquico de um doente submetido a reconstrução da bexiga com mucosa intestinal, devido a neoplasia. Na altura do isolamento encontrava-se com ventilação assistida por sistema de ventilação mecânica e algaliado. O primeiro isolamento de *A. baumannii*, obtido a partir da urina, não foi incluído neste estudo. Este apresentava um padrão de suscetibilidade semelhante ao apresentado pelo isolado AB-1. O doente manteve-se cultura-positivo para *A. baumannii* durante três meses no aspirado brônquico e na urina, tendo a colistina sido introduzida no esquema terapêutico a partir da caracterização de AB-1.

Em todos os ensaios, incluiu-se como controlo a estirpe de referência *A. baumannii* ATCC19606^T, uma estirpe tipo usada para controlo de qualidade dos antibiogramas manuais e automáticos usados nos hospitais (eg. bioMérieux VITEK®), que possui todas as características da espécie *Acinetobacter baumannii* e o perfil de resistência característico de uma estirpe dita “standard” ou padrão para o tratamento (124).

2.1.2 Meios de cultura, compostos e soluções

A composição e o modo de preparação dos meios de cultura, soluções e compostos utilizados neste trabalho estão descritos nas Tabelas 3 a 6. Todos os meios de cultura e soluções foram preparados com água destilada e, quando necessário, esterilizados por autoclavagem a 121°C durante 15 minutos a 1 bar.

Tabela 3 - Composição dos meios de cultura utilizados.

Meio de Cultura	Composição (por litro)
Mueller-Hinton broth (MHB) ⁽¹⁾	300g de infusão desidratada de carne; 17,5 g de caseína hidrolisada; 1,5 g de amido; 4,347 mg Ca ²⁺ ; 6,206 mg Mg ²⁺ ; pH 7,3 ± 0,1 a 25°C
Mueller-Hinton agar (MHA) ⁽¹⁾	300g de infusão desidratada de carne; 17,5 g de caseína hidrolisada; 1,5 g de amido; 17 g de agar; 4,347 mg Ca ²⁺ ; 6,206 mg Mg ²⁺ ; pH 7,3 ± 0,1 a 25°C

⁽¹⁾ Oxoid Ltd., Basingstoke, Inglaterra.

Tabela 4 - Composição e modo de preparação de soluções.

Solução	Composição/solução “stock”
Tampão fosfato salino (PBS*) 1X ⁽¹⁾	10 mM tampão fosfato; 2,7 mM KCl; 137 mM NaCl; pH 7.4 a 25°C
Glucose ^(1, 2)	0,2 g/mL em PBS estéril
Cloreto de sódio 0,9% (NaCl)	9 mg/mL
Cloreto de cálcio (CaCl ₂) ^(1, 2)	10 mg/mL
Cloreto de magnésio (MgCl ₂) ^(1, 2)	10 mg/mL

⁽¹⁾ Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA. ⁽²⁾ A solução depois de preparada foi filtrada com filtro de seringa estéril de PVDF de 0,22 µm de diâmetro de poro da Rotilabo®, Karlshure, Alemanha. *Do inglês “Phosphate Buffered Saline”.

Tabela 5 - Composição e modo de preparação das soluções de inibidores de efluxo e substrato de bombas de efluxo.

Solução	Diluição da solução “stock”
Carbonil cianeto <i>m</i> -clorofenilhidrazona (CCCP) ⁽¹⁾ pm = 204,62 g/mol	10 mg/mL em dimetilsulfóxido (DMSO) ⁽²⁾ ou metanol. Mantida a -20°C ao abrigo da luz
Clorpromazina (CPZ) ⁽¹⁾ pm= 355,33 g/mol	10 mg/mL em água bidestilada estéril Mantida a -20°C
“1-(1-naphthylmethyl)-piperazine” (NMP) ⁽¹⁾ pm = 226,32 g/mol	10 mg/mL em DMSO ⁽²⁾ ou metanol Mantida a -20°C
“Phe-arg β -naphthylamide dihydrochloride” (PA β N) ⁽¹⁾ pm= 519,47 g/mol	25 mg/mL em água bidestilada estéril Mantida a -20°C
Tioridazina (TZ) ⁽¹⁾ pm= 407,04 g/mol	10 mg/mL em água bidestilada estéril Mantida a -20°C ao abrigo da luz
Verapamil (VP) ⁽¹⁾ pm= 491,06 g/mol	10 mg/mL em água bidestilada estéril Mantida a -20°C
Brometo de etídio (EtBr) ⁽¹⁾	10 mg/mL água bidestilada estéril Mantida a 4°C ao abrigo da luz

⁽¹⁾ Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA. ⁽²⁾ Merck, Darmstadt, Alemanha.

Tabela 6 - Composição e modo de preparação das soluções de antibióticos utilizadas.

Solução	Diluição da solução “stock”
Amicacina (AK) ⁽¹⁾	10 mg/mL em água bidestilada estéril Mantida a -20°C
Ciprofloxacina (CIP) ⁽¹⁾	20 mg/mL em HCl 1% ⁽²⁾
Claritromicina (CLA) ⁽¹⁾	10 mg/mL em metanol
Colistina (CO) ⁽¹⁾	10 mg/mL em água bidestilada estéril
Eritromicina (ERI) ⁽¹⁾	10 mg/mL em metanol
Meropenem (MER) ⁽¹⁾	10 mg/mL em DMSO
Rifampicina (RD) ⁽¹⁾	10 mg/mL em metanol
Tetraciclina (TET) ⁽¹⁾	10 mg/mL em metanol

⁽¹⁾ Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA. ⁽²⁾ Panreac Quimica SA, Barcelona, Espanha (HCl 37%).

2.2 Métodos

2.2.1 Crescimento dos isolados em estudo

Os três isolados e estirpe de referência em estudo foram repicados em MHB suplementado com CaCl_2 (concentração final 25 mg/L) e MgCl_2 (concentração final 12,5 mg/L), de acordo com as recomendações do CLSI (125) a partir de culturas primárias em MHA, e incubados a 37°C durante a noite com agitação 180 rpm em incubadora MaxQ™4000 (Thermo scientific, Waltham, E.U.A.). Os “stocks” das culturas foram mantidos em meio líquido a -80°C, em 10% (v/v) de glicerol (Sigma-Aldrich, St. Louis, E.U.A.).

2.2.2 Determinação da suscetibilidade aos antibióticos pelo método de difusão em disco e Etest

A suscetibilidade aos agentes antimicrobianos foi determinada por difusão em disco pelo método de Kirby-Bauer e Etest conforme recomendado pelo CLSI (126). Os discos de antibióticos utilizados e respetiva carga estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Discos de antibióticos utilizados e carga do disco.

Antibiótico ⁽¹⁾	Carga do Disco (µg)
Ácido Nalidíxico (NA), Amicacina (AK), Cefepima (FEP), Ceftazidima (CAZ), Cefotaxima (CTX), Cefuroxima (CXM), Cefoxitina (FOX), Tetraciclina (TE)	30
Ampicilina (AMP), Gentamicina (CN), Tobramicina (TOB), Imipenem (IMP)	10
Ciprofloxacina (CIP), Rifampicina (RD)	5
Trimetoprim-sulfametoxazol (SXT)	1,25/23,75

⁽¹⁾ (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra).

Para a realização do antibiograma preparou-se uma suspensão bacteriana com concentração celular equivalente à da escala de 0.5 de McFarland e inocularam-se as placas de MHA por espalhamento em estrias apertadas com zaragatoa estéril. Os discos de antibiótico ou tira de Etest foram aplicados sobre o agar com o auxílio de uma pinça estéril. As placas foram incubadas a 37°C, durante 20 a 24 horas. Após este período, registou-se a medida do diâmetro dos halos de inibição para cada disco de antibiótico de acordo com as normas definidas pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (126). Para o Etest foi registado o valor da CMI correspondente ao valor da concentração de colistina no ponto de intersecção entre o halo e a tira de Etest.

Os resultados foram interpretados de acordo com os critérios definidos pelo EUCAST (127) e CLSI (128).

2.2.3 Determinação de concentrações mínimas inibitórias pelo método de diluição em microplaca para os antibióticos na presença dos compostos inibidores de efluxo

A concentração mínima inibitória dos antibióticos, IEs e substrato de bombas de efluxo foi determinada através do método de microdiluição seriada em placa de 96 poços, conforme as recomendações do Clinical and Laboratory Standards Institute (125). A CMI é definida como a menor concentração de um composto que inibe o crescimento visível de um microrganismo. Na Tabela 8 apresenta-se a gama de concentrações utilizadas na determinação da concentração mínima inibitória para todos os compostos testados.

Tabela 8 - Compostos e gama de concentrações utilizadas.

Composto	Gama de concentrações utilizadas (µg/mL)
Antibióticos	
AK	0,0078 a 1024
CIP	0,0156 a 2048
CLA	0,25 a 512
CO	0,0078125 a 512
ERI	0,125 a 1024
MER	0,25 a 512
RD	0,015625 a 128
TE	0,015625 a 1024
Inibidores de efluxo	
CCCP	0,5 a 256
CPZ	0,5 a 256
NMP	1 a 512
PAβN	4 a 2048
TZ	0,25 a 128
VP	4 a 4096
Substrato de efluxo	
EtBr	2 a 1024

AK - Amicacina, CIP- Ciprofloxacina, CLA - Claritromicina, CO - Colistina, ERI - Eritromicina, MER -Meropenem, RD - Rifampicina, TE - Tetraciclina; CCCP - Carbonil cianeto *m*-clorofenilhidrazona; CPZ - Clorpromazina; NMP - 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine; PAβN - Phe-arg β-naphthylamide dihydrochloride; TZ - Tioridazina; VP - Verapamil; EtBr - Brometo de Etídio.

Em todos os ensaios foram incluídos quatro controlos: i) controlo de esterilidade (apenas meio de cultura - CAMHB); ii) controlo de crescimento (CAMHB e estirpe sem composto); iii) controlo do solvente (CAMHB, estirpe e solvente à concentração usada para cada composto, para garantir que o solvente não inibe o crescimento celular; iv) controlo do composto (CAMHB e composto), como controlo de turbidez para a leitura dos resultados finais.

O crescimento dos isolados em estudo foi realizado como descrito no ponto 2.2.1. A cada poço da placa de 96 poços contendo 240 µl de CAMHB foi adicionado 20 µl de composto e efetuadas diluições seriadas 1:2, de modo a obter-se a gama de concentrações desejada para cada composto. De seguida, dispensou-se em cada poço 20 µl do inóculo, previamente ajustado à escala de 0,5 de McFarland (1×10^8) para um volume final de 150 µl. Posteriormente, para avaliar o efeito do composto inibidor de efluxo sobre o antibiótico, adicionou-se 10 µl do composto a uma concentração sub-inibitória determinada previamente. As placas foram incubadas a 37°C durante 20 a 24

horas e a leitura dos resultados foi realizada visualmente. Cada ensaio foi validado pela observação de crescimento bacteriano no controlo de crescimento (controlo positivo) e pela ausência de crescimento bacteriano no controlo de esterilidade do meio (controlo negativo). A determinação de CMI para cada estirpe e composto foi realizada em triplicado.

A interpretação dos resultados foi efetuada de acordo com os critérios definidos pelo EUCAST (127). Segundo a Norma nº 004/2013 de 21/02/2013 da Direção-Geral de Saúde (129) para os antibióticos não contemplados pelo EUCAST, foram utilizados os critérios de suscetibilidade definidos pelo CLSI (126). Para a interpretação da susceptibilidade para a colistina foram utilizados os critérios definidos pelo EUCAST, em que o isolado é considerado suscetível a este antibiótico se a CMI for igual ou inferior a 2 µg/mL e resistente se a CMI for superior a 2 µg/mL (127).

Com base nos valores de CMIs obtidos, determinou-se o Fator de Modulação (FM) (117) como se apresenta na seguinte fórmula:

$$FM = \frac{CMI \text{ ATB}}{CMI (ATB + IE)}$$

FM – Fator de Modulação; CMI – Concentração Mínima Inibitória; ATB – antibiótico; IE – Inibidor de Efluxo.

Na interpretação dos resultados do FM, considerou-se significativo um decréscimo da CMI igual ou superior a quatro vezes ($FM \geq 4$) (117).

2.2.4 Detecção preliminar da atividade de efluxo nos isolados em estudo pelo método de “Cartwheel” em placa de agar

O método de Cartwheel permite a deteção da atividade de efluxo bacteriana, utilizando o EtBr como substrato de bombas de efluxo. Quanto maior for a concentração de EtBr capaz de produzir fluorescência bacteriana num determinado isolado, maior será a atividade de efluxo do mesmo (75,111).

Prepararam-se placas de CAMHA contendo diferentes concentrações de EtBr (0 a 2,5 µg/mL), mantidas a 4°C, ao abrigo da luz. A partir da suspensão bacteriana de

cada isolado em estudo foram realizadas estrias em linha reta sobre o agar, do centro para a periferia, para cada isolado, como se apresenta na figura 7.

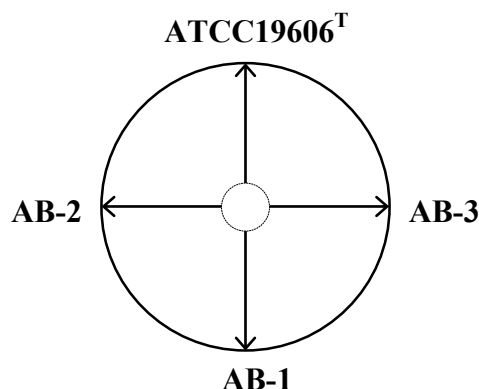


Figura 7 - Esquema representativo do método de inoculação dos isolados em estudo nas placas utilizadas nos ensaios de “Cartwheel” em placa de agar.

A estirpe de referência ATCC19606^T foi incluída em todos os ensaios como controlo. As placas foram incubadas a 37°C durante 24 horas, ao abrigo da luz, e visualizadas sob luz UV num sistema Gel DocTM XR System (Bio-Rad, Hercules, Califórnia, E.U.A.). Foi registada a concentração mínima de EtBr (MC_{EtBr}) capaz de produzir fluorescência bacteriana para cada isolado e estirpe de referência, a 37°C. Para verificar o efeito da temperatura na inibição da capacidade de efluxo bacteriana, as placas foram incubadas a 4°C durante 24 horas, e novamente visualizadas sob luz UV. Foi registada a concentração mínima de EtBr (MC_{EtBr}) capaz de produzir fluorescência bacteriana para cada isolado e estirpe de referência, a 4°C (111).

2.2.5 Método fluorométrico semi-automático em termociclador de tempo real Rotor GeneTM3000

O método fluorométrico semi-automático foi realizado num termociclador em tempo real Rotor GeneTM3000 (Corbett Research, Sydney). Este método tem por base um protocolo padronizado na Unidade de Microbiologia Médica do Instituto de Higiene e Medicina Tropical e permite a monitorização em tempo real da acumulação de EtBr no interior das células e do seu efluxo, através da leitura em tempo real da emissão de fluorescência nos comprimentos de onda de excitação e emissão deste composto: 530 e

585 nm, respetivamente (111,114,116). Os ensaios de acumulação permitem determinar a concentração de equilíbrio de EtBr, acima da qual ocorre a acumulação detetável deste composto, para seleccionar o inibidor de efluxo capaz de promover a maior acumulação de EtBr no interior da célula bacteriana (113).

2.2.5.1 Preparação dos isolados em estudo

Foram feitas culturas primárias dos isolados e estirpe de referência em meio MHA a partir do “stock”. As placas foram incubadas a 37°C, durante a noite. A partir das culturas em placa preparam-se culturas em meio líquido por inoculação de colónias isoladas em 10 mL de MHB. Os tubos foram incubados a 37°C com agitação 180 rpm. O crescimento foi acompanhado por medição da densidade óptica (DO) a 600 nm num espectrofotómetro Spectronic™ 20D+ (Thermo Scientific, Cambridge, Reino Unido) até atingir uma DO_{600nm} de 0,6. Uma vez atingido este valor, que corresponde à fase exponencial de crescimento, as células foram recolhidas em alíquotas de 1 mL, por centrifugação a 13 000 rpm durante 3 minutos à temperatura ambiente, numa mini-centrífuga Biofuge pico Heraeus (Kendro Laboratory Products, Osterode, Alemanha). O sedimento foi lavado duas vezes com tampão PBS 1x e a DO_{600nm} foi ajustada para 0.6 com adição do mesmo tampão (114,115).

2.2.5.2 Ensaio de acumulação de EtBr

Os ensaios de acumulação de EtBr foram realizados em micro-tubos de 200 µl, em alíquotas com um volume final de 100 µl. Para determinar a concentração de equilíbrio de EtBr para cada isolado, adicionou-se 50 µl da suspensão celular lavada a tubos de 200 µl contendo diferentes concentrações de EtBr (0,125; 0,25; 0,5; 1; 2; 3; 4; 5 µg/mL) na presença e ausência de glucose a 0,4%. Foram incluídos dois controlos: i) 50 µl de EtBr [0,125 a 5 µg/mL] e 50 µl PBS; ii) 50 µl suspensão celular e 50 µl PBS. Os tubos foram colocados no termociclador Rotor-Gene™3000 e os ensaios foram realizados a 37°C e a leitura da fluorescência de EtBr adquirida a 530 e emitida a 585 nm, após cada ciclo de 60 segundos, durante 30 minutos. Os ensaios foram realizados em triplicado.

2.2.5.3 Ensaio de acumulação de EtBr na presença de inibidores de efluxo

Para testar o efeito dos IEs na acumulação de EtBr, na presença/ausência de glucose, os isolados foram preparados como descrito no ponto 2.2.5.1. Preparam-se os seguintes tubos: i) 50 µl da suspensão celular e PBS; ii) 50 µl da suspensão celular e glucose 0,4%; iii) 50 µl da suspensão celular e EtBr (concentração de equilíbrio); iv) 50 µl da suspensão celular + EtBr (concentração de equilíbrio) +IE em estudo (concentração sub-inibitória); e v) 50 µl da suspensão celular + EtBr (concentração de equilíbrio) +IE em estudo (concentração sub-inibitória) + glucose 0,4%. Os tubos foram colocados no termociclador Rotor-GeneTM3000 e os ensaios foram realizados a 37°C e a leitura da fluorescência de EtBr adquirida a 530 e emitida a 585 nm, após cada ciclo de 60 segundos, durante 30 minutos. Os ensaios foram realizados em triplicado.

A partir dos valores de fluorescência relativa obtidos, foi calculada a Fluorescência Final Relativa (FFR) para cada isolado e inibidor de efluxo (130), como se apresenta na seguinte fórmula:

$$FFR = \frac{FR \text{ (tratado)} - FR \text{ (não tratado)}}{FR \text{ (não tratado)}}$$

FFR – Fluorescência final relativa aos 30'; FR– Fluorescência relativa aos 30'.

A FFR reflete a diferença entre a acumulação de EtBr no isolado na presença/ausência de IE, ou seja, a capacidade desse IE proporcionar a retenção de EtBr no interior da célula (130).

2.2.5.4 Ensaio de efluxo de EtBr na presença de inibidores de efluxo

Para avaliar o efeito dos inibidores de efluxo VP, TZ, CPZ e PAβN no efluxo de EtBr, os isolados foram preparados como descrito no ponto 2.3.5.1. Seguidamente, o sedimento foi lavado uma vez com tampão PBS 1x e a DO_{600nm} foi ajustada para 0.3 com adição do mesmo tampão. A suspensão celular foi incubada na presença de EtBr (na concentração de equilíbrio) e o inibidor de efluxo verapamil, numa concentração sub-inibitória, durante 60 minutos, à temperatura ambiente. Após esse período, as células foram recolhidas em alíquotas de 1 mL, por centrifugação a 13 000 rpm durante 10 minutos à temperatura ambiente. O sedimento foi ressuspensionado para uma DO_{600nm} de 0,6 em tampão PBS 1x. Prepararam-se os seguintes tubos: i) 50 µl suspensão celular e 50 µl PBS; ii) 50 µl de EtBr [equilíbrio] e 50 µl PBS; iii) 50 µl suspensão celular e 50 µl de EtBr [equilíbrio]; iv) 50 µl suspensão celular, 50 µl de IE [sub-inibitória] + EtBr [equilíbrio]; e v) 50 µl suspensão celular, 50 µl de IE [sub-inibitória] + EtBr [equilíbrio] + glucose 0,4%. Os tubos foram colocados no termociclador Rotor-GeneTM3000 e os ensaios foram realizados a 37°C durante 30 minutos e as leituras de fluorescência foram adquiridas a cada ciclo de 30 segundos, a 530 e 585 nm. Os ensaios foram realizados em triplicado.

A análise comparativa dos resultados dos ensaios de efluxo de EtBr realizou-se através da normalização dos dados obtidos pelo termociclador Rotor GeneTM3000. A fluorescência produzida pela acumulação intracelular máxima de EtBr, devido à ação do inibidor de efluxo e na ausência de glucose, foi definida como o valor de fluorescência máxima (fluorescência relativa equivalente a um) que pode ser obtido durante um ensaio. A fluorescência relativa dos restantes tubos foi obtida através do rácio entre os valores de fluorescência de efluxo para o isolado em estudo e o valor de fluorescência máxima, por unidade de tempo (114,115).

3. RESULTADOS

3.1 Caracterização fenotípica dos isolados AB-1, AB-2, AB-3 e estirpe de referência ATCC19606^T

Em primeiro lugar, foi determinado o perfil de suscetibilidade aos antibióticos dos três isolados clínicos em estudo, através dos métodos de difusão por disco e Etest, com o intuito de determinar se estes isolados apresentam fenótipo MDR, conforme suspeita clínica.

3.1.1 Determinação do perfil de suscetibilidade aos antibióticos pelo método de difusão por disco e Etest

Os resultados do perfil de suscetibilidade aos antibióticos para os três isolados de *A. baumannii* em estudo e para a estirpe de referência *A. baumannii* ATCC19606^T em estudo pelo método de difusão em disco, de acordo com os critérios definidos pelo EUCAST e CLSI (126,127). Para a colistina, foi determinada a CMI pelo método de Etest, de acordo com procedimentos e critérios definidos pelo EUCAST e CLSI (126,127).

De acordo com os critérios acima referidos, os três isolados e a estirpe de referência em estudo foram classificados quanto à sua suscetibilidade, como resistente, intermédia ou suscetível, aos antibióticos de diferentes categorias testados. Os resultados estão apresentados nas Tabelas 9 e 10.

Tabela 9 - Perfil de suscetibilidade dos isolados em estudo determinado pelo método de difusão por disco.

Classe /ATB	ATCC19606 ^T		AB-1		AB-2		AB-3	
	Ø (mm)	S/I/R	Ø (mm)	S/I/R	Ø (mm)	S/I/R	Ø (mm)	S/I/R
Aminoglicosídeos								
CN ²	10	R	Ø	R	Ø	R	Ø	R
TOB ²	7	R	Ø	R	Ø	R	Ø	R
AK ²	15	S	Ø	R	Ø	R	Ø	R
Carbapenemos								
IPM ²	19	I	2	R	17	S	11	R
Penicilinas								
AMP ³	Ø	R	Ø	R	Ø	R	Ø	R
Cefalosporinas								
CTX ³	10	R	Ø	R	Ø	R	11,5	R
CXM ¹	Ø	NA	Ø	NA	Ø	NA	Ø	NA
CAZ ³	0	R	Ø	R	Ø	R	0	R
FEP ³	Ø	R	Ø	R	Ø	R	Ø	R
FOX ¹	Ø	NA	Ø	NA	Ø	NA	Ø	NA
Quinolonas								
NA ¹	15	NA	Ø	NA	Ø	NA	Ø	NA
CIP ²	15	R	Ø	R	Ø	R	Ø	R
Tetraciclina								
TE ³	16	S	Ø	R	Ø	R	Ø	R
Outros								
RD ¹	17	NA	17	NA	14	NA	14	NA
SXT ²	Ø	R	Ø	R	Ø	R	Ø	R

R- Resistente; I – Intermédia; S- Suscetível. Ø – diâmetro/sem halo. NA – não aplicável. ¹ Sem critérios de interpretação da suscetibilidade definidos para estes compostos. ² Segundo os critérios definidos pelo EUCAST (2014). ³ Segundo os critérios definidos pelo CLSI (2013).

Tabela 10 - Determinação da CMI para a colistina pelo método de Etest para os isolados e estirpe de referência de *A. baumannii* em estudo.

Etest	CMI (µg/mL) / perfil de suscetibilidade			
	<i>A. baumannii</i>			
	ATCC19606 ^T	AB-1	AB-2	AB-3
Colistina¹	0,75 / S	0,5 / S	4 / R	12 / R

CMI – Concentração Mínima Inibitória; R- Resistente; S- Suscetível.¹Segundo o critério de interpretação definido pelo EUCAST (2014).

Pelo perfil de suscetibilidade apresentado para os antibióticos em estudo, a estirpe de referência ATCC19606^T e os três isolados foram considerados MDR, segundo os critérios definidos por Magiorakos *et al.*, 2011 (31) para o género *Acinetobacter*. De acordo com o referido estudo, os isolados de *Acinetobacter* spp. são classificados como MDR quando são resistentes a um ou mais antibióticos de pelo menos 3 classes diferentes (31). Acresce ainda que, de acordo este estudo, estes isolados clínicos são igualmente considerados extensivamente resistentes (XDR) pois são resistentes a um ou mais antibióticos de todas as classes menos duas categorias de antibióticos (31). Os isolados XDR são altamente importantes na clínica, para os quais não restam opções terapêuticas empíricas disponíveis, limitando-se à combinação sinérgica entre antibióticos ou aumento da dosagem (131).

Neste trabalho, para efeitos da análise fenotípica e da avaliação da contribuição do efluxo para o perfil de resistência destes isolados, utilizar-se-á apenas a designação MDR, uma vez que o objetivo pretendido se centra no efluxo de múltiplos substratos como origem da multirresistência apresentada pelos mesmos.

3.2 Detecção da atividade de efluxo nos isolados e estirpe de referência de *A. baumannii* em estudo

Para verificar a contribuição da atividade de efluxo para os fenótipos MDR apresentados pelos isolados em comparação com a estirpe de referência em estudo, utilizou-se o método de “Cartwheel”. Este método permite realizar uma avaliação preliminar da atividade de efluxo para os três isolados, em simultâneo, comparar esta atividade relativamente à atividade de efluxo demonstrada pela estirpe de referência ATCC19606^T.

3.2.1 Detecção preliminar da atividade de efluxo pelo método de “Cartwheel” em placa de agar

Através deste método, foi possível determinar a atividade de efluxo dos isolados em estudo e comparar a mesma com a atividade apresentada pela estirpe de referência *A. baumannii* ATCC19606^T. Adicionalmente, verificou-se o efeito da temperatura na atividade dos sistemas de efluxo, por incubação das placas em duas temperaturas diferentes: 37°C e 4°C.

Os resultados estão apresentados na Figura 8.

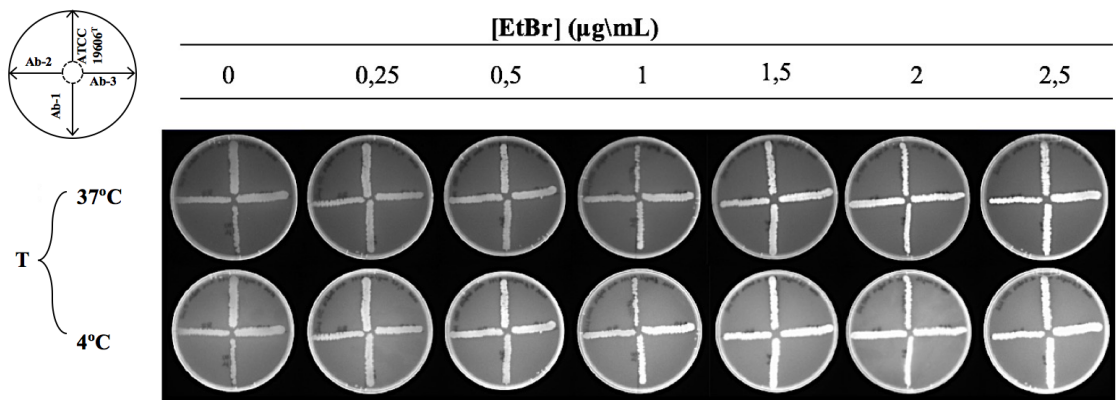


Figura 8 – Imagens representativas dos resultados obtidos no ensaio de "Cartwheel" em placa de agar para detecção preliminar da atividade de efluxo nos isolados e estirpe de referência em estudo.

Pela análise das fotografias obtidas, confirma-se que todos os isolados e estirpe de referência em estudo apresentam fluorescência significativa em altas concentrações de EtBr (a partir de 1,5 µg/mL). A concentração mais baixa de EtBr capaz de produzir fluorescência visível de cada isolado foi determinada e designada a concentração mínima de EtBr (MC_{EtBr}), a qual é apresentada na Tabela 11. Este valor traduz a concentração a partir da qual o isolado começa a acumular EtBr devido à sua capacidade de efluxo não ser capaz de efluxar este substrato. Quando mais elevada a MC_{EtBr} , maior a capacidade de efluxo.

Tabela 11 - Determinação de MC_{EtBr} para os três isolados e estirpe de referência ATCC19606^T.

Estirpe/Isolado	MC_{EtBr} (µg/mL)	
	37°C	4°C
ATCC19606 ^T	1,0-1,5	0,5
AB-1	2	0,5
AB-2	2	0,5
AB-3	1,5	0,5

Após incubação a 37°C, podemos verificar que para a estirpe de referência ATCC19606^T a MC_{EtBr} encontra-se entre 1,0 e 1,5 µg/mL. Para os isolados AB-1 e AB-2, é necessária uma maior concentração de EtBr para se detetar fluorescência visível significativa ($MC_{EtBr}=2$ µg/mL), pelo que podemos inferir que nestes dois isolados existe maior atividade de efluxo em relação à estirpe de referência. Pelo contrário, o isolado AB-3 apresenta uma MC_{EtBr} de 1,5 µg/mL, intuindo uma capacidade de efluxo semelhante à apresentada pela estirpe de referência ATCC19606^T.

Adicionalmente, através da incubação a 4°C das placas previamente incubadas a 37°C, foi possível observar a diminuição significativa da atividade de efluxo demonstrada por todos os isolados, com MC_{EtBr} de 0,5 µg/mL, o que demonstra que a temperatura é um fator condicionante da atividade de efluxo. Esta é a prova fisiológica que a ausência de fluorescência visível em certas concentrações, nos isolados a 37°C se deve ao efluxo ativo de EtBr, sendo esta uma metodologia grosseira, porém eficaz, na deteção e evidenciação da atividade de efluxo em isolados clínicos (75,111).

3.2.2 Detecção da atividade de efluxo pelo método fluorométrico semi-automático em termociclador de tempo real Rotor GeneTM3000

Para confirmação da atividade de efluxo observada pelo método de “Cartwheel”, realizaram-se ensaios de acumulação de EtBr pelo método fluorométrico semi-automático em termociclador de tempo real Rotor GeneTM3000. Para a interpretação de resultados destes ensaios, deve ter-se em conta os seguintes pontos: i) o influxo de EtBr nas células decorre por difusão passiva devido à permeabilidade da parede celular bacteriana; ii) após entrada na célula, o EtBr liga-se aos ácidos nucleicos, proteínas intracelulares e periplasmáticas; iii) a acumulação de EtBr no interior da célula ocorre por inibição do efluxo, perdendo-se o equilíbrio entre a sua entrada por difusão passiva e saída por transporte ativo; iv) a intensidade do nível de fluorescência emitido pelas células traduz a quantidade de EtBr no interior das mesmas (114). Do mesmo modo, nestes ensaios foi fornecida uma fonte de energia (glucose a 0,4%) para as células, pois todas as BE com capacidade para expelir antibióticos possuem dependência energética, como é um exemplo a família RND, que depende do potencial protónico (20,92,114).

Previamente à realização dos ensaios de acumulação de EtBr na presença dos IEs, determinou-se: i) a concentração de equilíbrio de EtBr (concentração na qual existe um equilíbrio entre a entrada e saída de EtBr da célula bacteriana) e ii) valores de CMIs para os IEs em estudo (VP, TZ, CPZ, NMP, CCCP e PAβN), para cada isolado e estirpe de referência em estudo. Para determinar a concentração de equilíbrio de EtBr, realizou-se um ensaio de acumulação deste composto, em que os isolados e estirpe de referência em estudo foram expostos a concentrações crescentes de EtBr (0,25 a 5 µg/mL). Considerou-se como concentração de equilíbrio de EtBr a concentração que apresentou níveis baixos de acumulação, com fluorescência relativa entre 10 a 15%. Nesta concentração, é possível visualizar-se os efeitos da acumulação de EtBr nas células sem prejudicar a viabilidade celular.

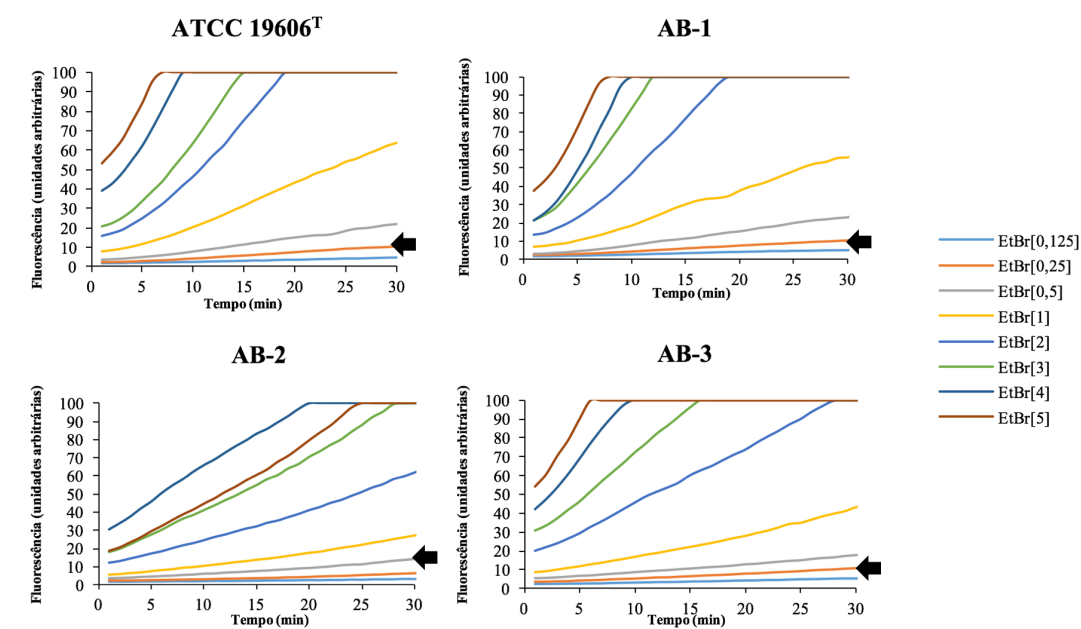


Figura 9 - Determinação da concentração de equilíbrio de EtBr. (As concentrações de EtBr ($\mu\text{g/mL}$) estão indicadas entre parêntesis retos []).

Com base nos resultados obtidos pela detecção da fluorescência no ensaio fluorométrico de acumulação de EtBr representados na Figura 9, determinou-se que a concentração de EtBr para ser utilizada em todos os ensaios de fluorimetria é de 0,25 $\mu\text{g/mL}$ para a estirpe de referência ATCC19606^T, isolado AB-1 e isolado AB-3 e de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ para o isolado AB-2 (isolado que já anteriormente havia demonstrado na técnica de “Cartwheel” maior capacidade de efluxo (MC_{EtBr} de 2 $\mu\text{g/mL}$). A partir destes valores, será detetada acumulação intracelular de EtBr.

Os ensaios de acumulação de EtBr com adição de glucose a 0,4% estão representados na Figura 10. Nestes ensaios, o valor da concentração de equilíbrio aumentou para 1 $\mu\text{g/mL}$, para todos os isolados e estirpe de referência em estudo. Tal como esperado, com a adição de uma fonte de energia para as BEs, a sua atividade é potenciada, o que levará à necessidade de uma maior concentração de EtBr para que se atinja a concentração de equilíbrio entre o influxo e efluxo deste substrato, e, apenas excedendo esta concentração, haverá acumulação intracelular deste composto. Mais uma demonstração da intensa atividade de efluxo nestes isolados.

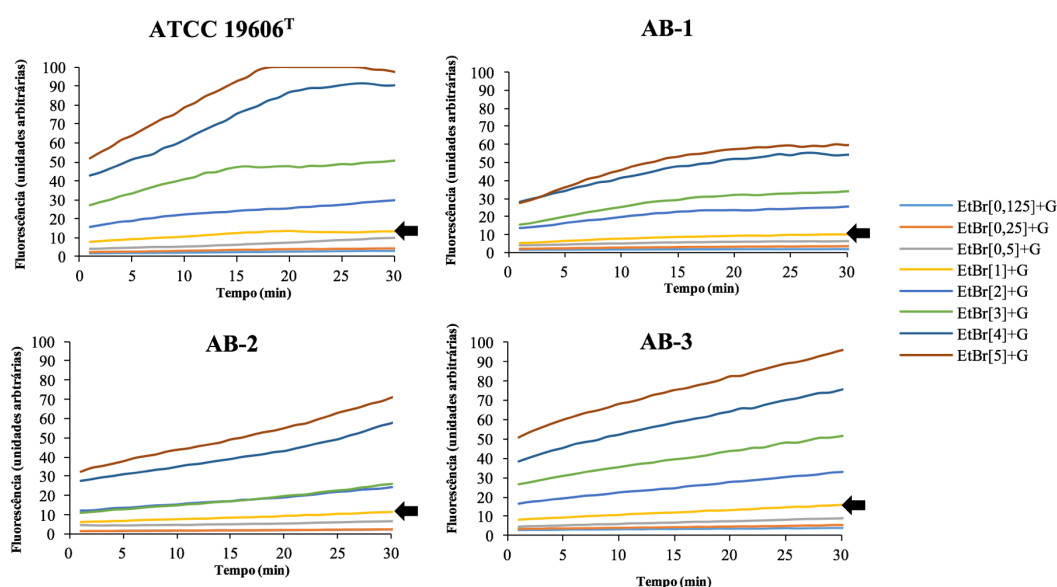


Figura 10 - Ensaio de acumulação de EtBr na presença de glucose a 0,4%. (As concentrações de EtBr ($\mu\text{g/mL}$) estão indicadas entre parêntesis retos []).

Em seguida, foram determinados os valores de CMIs para os IEs (VP, TZ, CPZ, NMP, CCCP e PA β N), para cada isolado e estirpe de referência em estudo, através do método de diluição em microplaca (125), para determinação das concentrações sub-inibitórias destes compostos que irão subsequentemente ser utilizadas nos ensaios de fluorometria e de avaliação do sinergismo com os antibióticos no sentido de avaliar a capacidade dos IEs potenciarem a atividade dos antibióticos. Estes valores são apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 - Valores da CMIs para os inibidores de bombas de efluxo e EtBr nos isolados e estirpe de referência de *A. baumannii* em estudo.

IE	CMI ($\mu\text{g/mL}$)			
	ATCC19606 ^T	AB-1	AB-2	AB-3
VP	>2048	1024	4096	2048
TZ	128	64	128	128
CPZ	64	64	64	64
NMP	512	512	512	256
PA β N	2048	1024	1024	2048
CCCP	128	32	64	64
EtBr	512	1024	1024	1024

IE – Inibidor de efluxo; CMI – Concentração Mínima Inibitória; EtBr - Brometo de Etídio; VP – Verapamil; TZ - Tioridazina; CPZ - Clorpromazina; NMP - “1-(1-naphthylmethyl)-piperazine”; PA β N - “Phe-arg β -naphthylamide dihydrochloride”; CCCP - Carbonil cianeto m-clorofenilhidrazona.

Pela análise dos resultados obtidos, verifica-se que os IEs com maior efeito na viabilidade celular (CMIs mais baixas) são o CPZ e CCCP, sendo necessária uma menor concentração destes compostos para inibir o crescimento celular dos isolados em estudo. Os IEs com menor efeito na viabilidade celular são o VP e PAβN. De um modo geral, o isolado AB-1 apresenta maior suscetibilidade aos IEs testados, em comparação com os outros isolados e estirpe de referência ATCC19606^T.

A estirpe de referência ATCC19606^T é a que apresenta menor suscetibilidade, de um modo geral, aos IEs em estudo, sendo mais uma evidência indireta de que os isolados clínicos em estudo estão fisiologicamente dependentes da capacidade de efluxo adquirida, provavelmente, devido à pressão antibiótica.

Com base nos valores de CMIs para cada IE, determinou-se a concentração de cada IE para ser usada nos ensaios fluorométricos subsequentes. Para tal, realizou-se a otimização dos ensaios de acumulação de EtBr na presença destes IEs em diferentes concentrações sub-inibitórias, para que estes compostos não afetassem a viabilidade celular dos isolados, nas condições e período de tempo necessários à realização dos mesmos. Estas concentrações estão apresentadas na Tabela 13.

Tabela 13 - Concentrações de inibidores de efluxo para os ensaios de fluorimetria em tempo real.

IE	[IE] (µg/mL)			
	ATCC19606 ^T	AB-1	AB-2	AB-3
VP	512 (1/4 CMI)	512 (1/2 CMI)	256 (1/16)	256 (1/4 CMI)
TZ	64 (1/2 CMI)	32 (1/2 CMI)	32 (1/4 CMI)	64 (1/2 CMI)
CPZ	32 (1/2 CMI)	32 (1/2 CMI)	32 (1/2 CMI)	32 (1/2 CMI)
NMP	128 (1/4 CMI)	256 (1/2 CMI)	256 (1/2 CMI)	128 (1/2 CMI)
PAβN	512 (1/4 CMI)	512 (1/2 CMI)	512 (1/2 CMI)	512 (1/4 CMI)
CCCP	64 (1/2 CMI)	16 (1/2 CMI)	32 (1/2 CMI)	32 (1/2 CMI)

IE – Inibidor de efluxo; EtBr - Brometo de Etídio; VP – Verapamil; TZ - Tioridazina; CPZ - Clorpromazina; NMP - “1-(1-naphthylmethyl)-piperazine”; PAβN - “Phe-arg β-naphthylamide dihydrochloride”; CCCP - Carbonil cianeto m-clorofenilhidrazona.

3.2.2.1 Avaliação da acumulação de EtBr na presença de inibidores de efluxo

Para determinar o efeito dos IEs na acumulação intracelular de EtBr para os isolados em estudo, procedeu-se como descrito no ponto 2.2.5.3 do Material e Métodos. Os resultados obtidos da fluorescência (unidades arbitrárias) em função do tempo (em minutos) para os isolados em estudo na presença dos IEs e na ausência da glucose, estão apresentados na Figura 11.

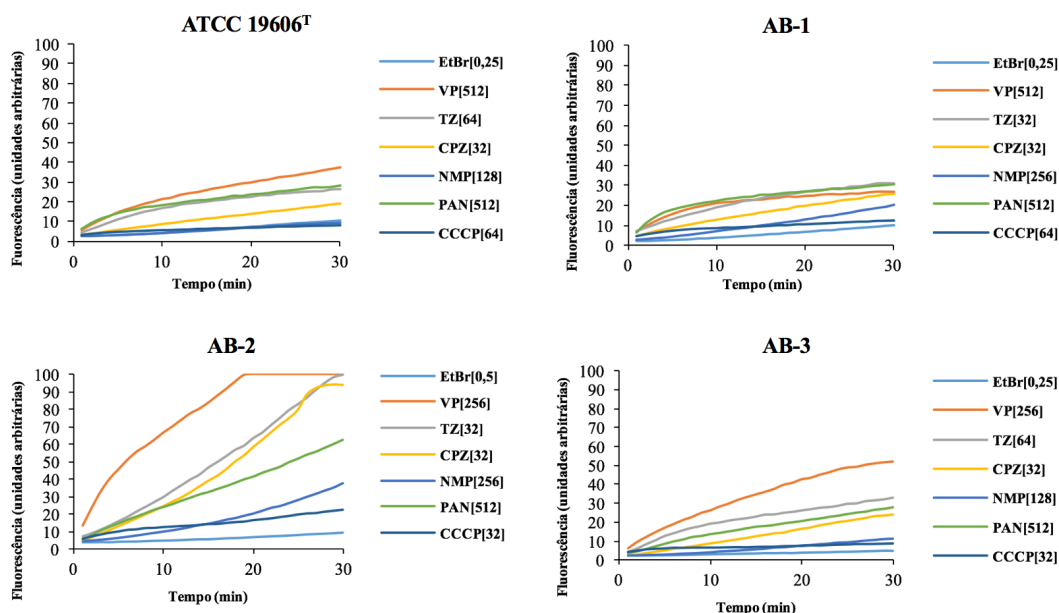


Figura 11 - Efeito dos inibidores de efluxo na acumulação de EtBr na ausência de glucose. (Concentração de equilíbrio de EtBr: ATCC19606^T, AB-1 e AB-3 [0,25 µg/mL]; AB-2 [0,5 µg/mL]. As concentrações de compostos inibidores de efluxo (µg/mL) estão indicadas entre parêntesis retos []. EtBr - Brometo de ; VP – Verapamil; TZ - Tioridazina; CPZ - Clorpromazina; NMP - “1-(1-naphthylmethyl)-piperazine”; PAN - “Phe-arg β-naphthylamide dihydrochloride”; CCCP - Carbonil cianeto *m*-clorofenilhidrazona).

Para a estirpe de referência ATCC19606^T, observa-se que o VP é o IE que mais potencia a acumulação de EtBr, seguido pelo PAβN, TZ e CPZ. No caso do isolado AB-1, o TZ é o inibidor mais eficaz no aumento da acumulação de EtBr, seguido pelo PAβN, VP e CPZ. O isolado AB-2 apresenta maior acumulação de EtBr pelo VP e TZ, de forma idêntica, seguido pelo CPZ e PAβN. Para o isolado AB-3, os IEs com maior efeito na acumulação de EtBr são o VP, TZ, CPZ e PAβN.

De um modo geral, verifica-se que os inibidores VP, TZ, CPZ e PAβN são os que apresentam maior efeito potenciador da acumulação de EtBr, para todos os isolados em estudo. Da mesma forma, o NMP e CCCP são os que demonstraram ter menos efeito na acumulação de EtBr, quando comparados com os restantes IEs em estudo.

Adicionalmente, verificamos que o isolado AB-2 apresenta uma capacidade de retenção intracelular de EtBr aumentada em comparação com os outros isolados em estudo, na presença destes IEs. Este isolado apresentava igualmente sinais de ter a sua atividade de efluxo aumentada pelo método de “Cartwheel”, e foi o isolado que evidenciou uma maior concentração de equilíbrio de EtBr (0,5 µg/mL) do que os restantes isolados (0,25 µg/mL), o que leva uma vez mais a inferir que possuirá maior atividade de efluxo.

Na Figura 12 estão apresentados os resultados obtidos nos ensaios de acumulação de EtBr na presença dos IEs em estudo, com a adição de glucose 0,4% como fonte de energia para as bombas de efluxo.

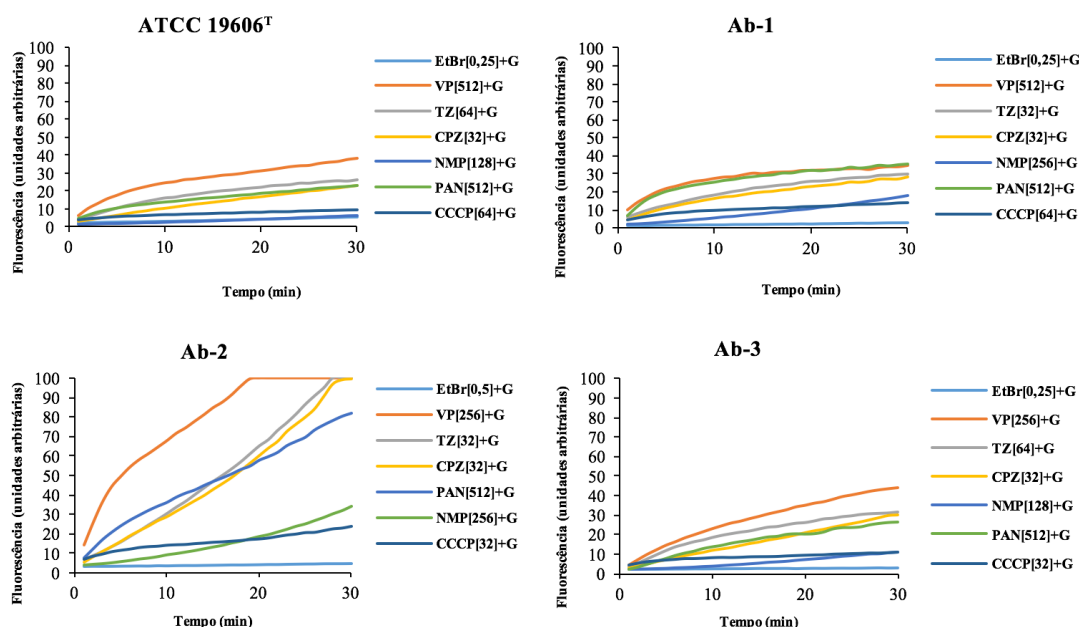


Figura 12 - Efeito dos inibidores de efluxo na acumulação de EtBr na presença da glucose. (Concentração de equilíbrio de EtBr: ATCC19606^T, AB-1 e AB-3 [0,25 µg/mL]; AB-2 [0,5 µg/mL]. As concentrações de compostos inibidores de efluxo (µg/mL) estão indicadas entre parêntesis []. EtBr - Brometo de etídio; VP – Verapamil; TZ - Tioridazina; CPZ - Clorpromazina; NMP - “1-(1-naphthylmethyl)-piperazine”; PABN - “Phe-arg β-naphthylamide dihydrochloride”; CCCP - Carbonil cianeto m-clorofenilhidrazona).

Para a estirpe de referência ATCC19606^T, na presença de glucose 0,4%, o VP é igualmente o IE com maior efeito na acumulação de EtBr, seguindo-se o TZ, PAβN e CPZ. Para o isolado AB-1, o PAβN é o que apresenta maior efeito, seguido pelo VP, TZ e CPZ. O isolado AB-2 apresenta igualmente maior acumulação de EtBr pelo VP e TZ, de forma idêntica, seguido pelo CPZ e PAβN. No caso do isolado AB-3, os IEs com maior efeito na acumulação de EtBr são, por ordem decrescente, o VP, TZ, CPZ e PAβN.

Uma vez mais, verifica-se que tanto na ausência como na presença de glucose a 0,4%, os compostos com maior efeito na acumulação de EtBr nos isolados em estudo e na estirpe de referência são VP, TZ, CPZ e PAβN e que os IEs com menor efeito são o NMP e CCCP. Para os isolados em estudo, e como esperado, verifica-se que a adição de glucose diminui a acumulação máxima de EtBr obtida pela observação de valores mais baixos de fluorescência demonstrados pelo isolado na presença de IEs de efluxo, em relação aos mesmos na ausência destes compostos. Demonstra-se assim que o efluxo ativo dependente da energia desempenha um papel importante na fisiológica de *A. baumannii* e que, uma vez mais, o isolado AB-2 apresenta uma capacidade de retenção intracelular de EtBr aumentada em comparação com os outros isolados em estudo, na presença da glucose a 0,4%, manifestando um comportamento altamente efluxivo.

Para melhor compreender o efeito destes inibidores no efluxo e acumulação de EtBr, tanto na ausência como na presença de glucose, calculou-se a Fluorescência Final relativa (FFR), como descrito no ponto 2.2.5.3 (Material e Métodos). A FFR reflete a capacidade de um IE em potenciar a retenção de EtBr no interior da célula, ou seja, quanto maior for a diferença entre o valor de FR na presença do inibidor em relação à FFR basal do isolado (FFR=0,0), maior será o efeito inibitório sobre o sistema de efluxo desse isolado. Os valores de FFR para cada isolado e estirpe de referência ATCC19606^T estão representados na Tabela 14.

Tabela 14 - Valores de Fluorescência Final Relativa para os inibidores de efluxo em estudo.

IE	Fluorescência Final Relativa							
	ATCC19606 ^T		AB-1		AB-2		AB-3	
	s/G	+G	s/G	+G	s/G	+G	s/G	+G
VP	2,1	6,7	1,6	6,0	11,9	22,5	7,8	13,4
TZ	1,4	5,1	2,0	4,6	11,9	21,1	5,3	10,5
CPZ	0,8	4,3	1,3	4,3	7,8	22,5	3,6	10,0
PAβN	1,6	4,6	1,6	5,4	7,6	19,0	1,2	2,7
NMP	-0,1	0,4	1,0	2,7	4,2	7,4	4,4	8,7
CCCP	-0,3	0,7	0,2	1,6	1,8	4,4	0,6	2,0

IE – Inibidor de efluxo; s/G – ausência de glucose 0,4%; +G – presença de glucose 0,4%; VP – Verapamil; TZ - Tioridazina; CPZ - Clorpromazina; NMP - “1-(1-naphthylmethyl)-piperazine”; PAβN - “Phe-arg β-naphthylamide dihydrochloride”; CCCP - Carbonil cianeto *m*-clorofenilhidrazona..

Pela análise dos resultados, é possível confirmar que os inibidores VP, TZ, CPZ e PAβN apresentam a maior capacidade de proporcionar retenção de EtBr na célula, para todos os isolados, enquanto que os inibidores com menor efeito na acumulação de EtBr foram o NMP e CCCP, pois apresentam os valores de FFR mais baixos em todos os isolados e estirpe de referência, com a exceção de um efeito pontual do NMP no isolado AB-3 (FFR=4,4).

O isolado AB-1 e a estirpe de referência ATCC19606^T confirmam a existência de um efluxo basal de EtBr, ao apresentarem os valores mais baixos de FFR enquanto que o isolado AB-2, seguido do isolado AB-3, são os que possuem maior capacidade de efluxo e são os que possuem os valores de FFR mais elevados na presença de VP, TZ, CPZ e PAβN (no entanto, como já referido, o NMP apresentou um efeito pontual na acumulação de EtBr, superior à FFR demonstrados pelo CPZ e PAβN). Os inibidores NMP e CCCP demonstraram pouca atividade inibitória duradoura pois são desacopladores de efeito rápido cujo efeito desenergizante é rapidamente repostado pelas fontes energéticas bacterianas o que inviabiliza a sua aplicação em ensaios de efluxo sendo possível avaliá-los apenas em ensaios de acumulação.

3.2.2.2 Avaliação do efluxo de EtBr na presença de inibidores de efluxo

Para avaliação e confirmação do efeito dos IEs VP, TZ, CPZ e PAβN no efluxo de EtBr dos três isolados e estirpe ATCC19606^T, foram realizados ensaios fluorométricos em tempo real em termociclador Rotor GeneTM3000. Tal como anteriormente referido, o NMP e CCCP não foram testados pois são desacopladores de efeito rápido, que só atuam quando presentes em solução, pelo que os seus resultados na inibição duradoura do efluxo são dificilmente mensuráveis por esta técnica de medição em tempo real do efluxo. A fluorescência relativa dos três isolados e estirpe de referência ATCC19606^T após incubação com EtBr na presença de VP, em função do tempo e exposição aos IEs em estudo, apresenta-se na Figura 13.

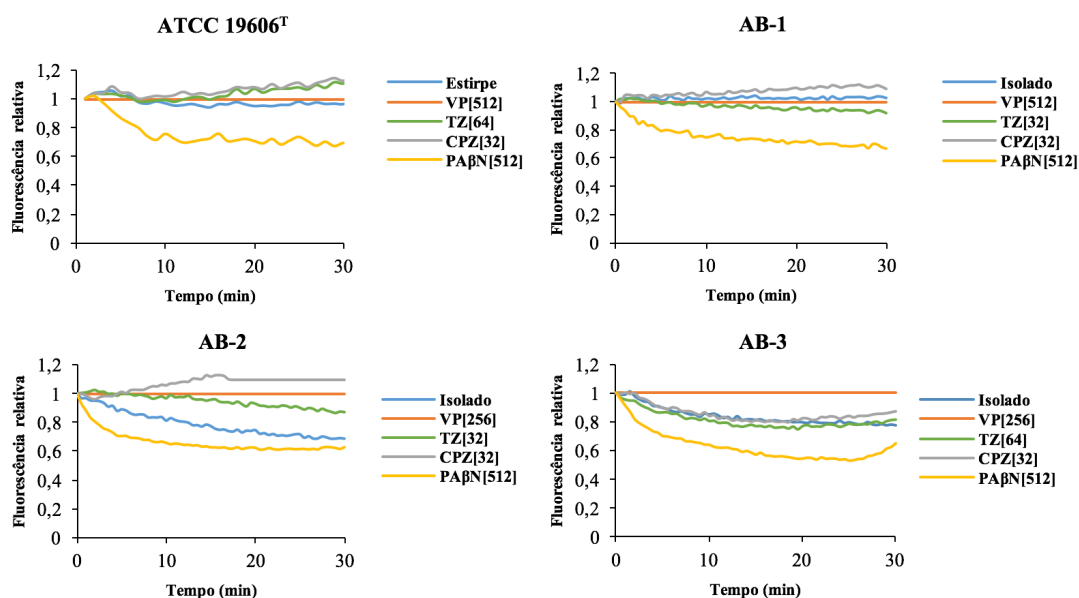


Figura 13 - Ensaios fluorométricos de efluxo de EtBr na presença de inibidores de efluxo (IEs). As concentrações de IEs ($\mu\text{g/mL}$) estão indicadas entre parêntesis retos []. Legenda: VP – Verapamil; TZ - Tioridazina; CPZ - Clorpromazina; PAβN - “Phe-arg β -naphthylamide dihydrochloride”.

Pela observação dos gráficos obtidos, é possível confirmar que para a estirpe ATCC19606^T e isolados AB-1 e AB-2, o VP, TZ e CPZ possuem um efeito mais significativo e mais duradouro na retenção de EtBr no interior da célula, pois a FR apresentada é próxima ou igual a 1 mesmo depois das células serem lavadas do efeito

do IE. A fluorescência relativa de 1 corresponde ao bloqueio do efluxo celular de EtBr, não havendo extrusão deste composto para o espaço extracelular. No entanto, verifica-se que o PA β N, ao contrário do observado nos ensaios de acumulação, não tem capacidade de continuar a inibir o efluxo de EtBr, uma vez lavado o VP das células (vide Materiais e Métodos ponto 2.2.5.4), nos três isolados e estirpe ATCC19606^T, evidenciando o seu comportamento de inibidor de efluxo competitivo, ao invés dos restantes, que são inibidores de fontes de energia para o efluxo ativo, e, como tal, com um efeito mais duradouro. É possível também observar que o isolado AB-2 é o que demonstra maior capacidade de efluxo, pois, após a lavagem das células, demonstra uma maior diminuição da FR do que os restantes isolados. O isolado AB-3 apresenta menor atividade de efluxo do que o isolado AB-2. No entanto, verifica-se menor efeito do TZ e CPZ na acumulação de EtBr, estando os valores de FR semelhantes aos do efluxo basal deste isolado. A estirpe ATCC19606^T e o isolado AB-1 não apresentam atividade de efluxo de EtBr significativa, mantendo-se os seus níveis de efluxo basal no nível máximo de FR. Para avaliar a influência da adição de glucose 0,4% no efeito dos IEs no efluxo, foram realizados ensaios de fluorimetria em tempo real, após incubação com EtBr na presença de VP. Os resultados obtidos nestes ensaios estão apresentados na Figura 14.

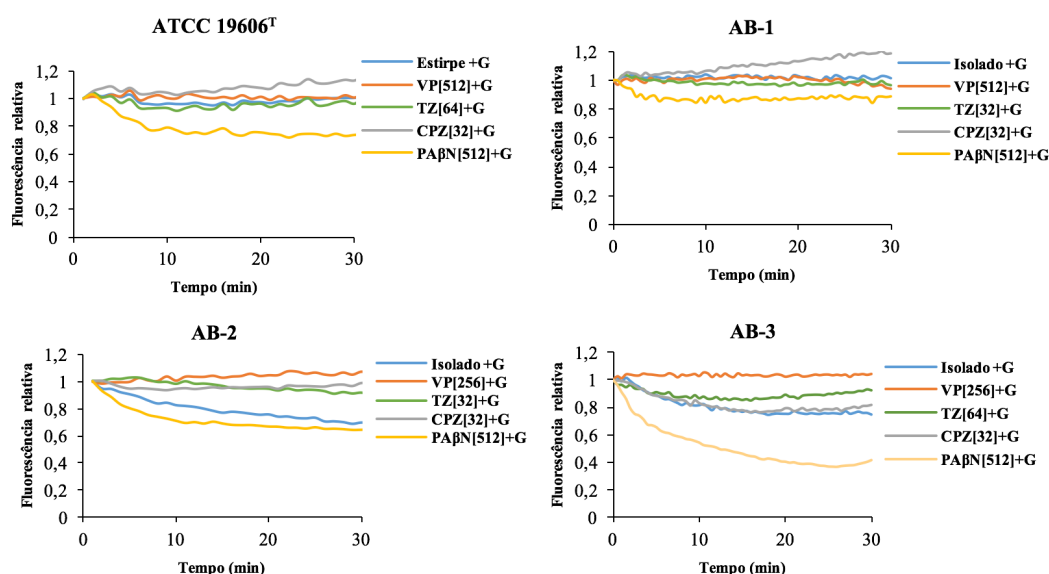


Figura 14 - Ensaios fluorométricos de efluxo de EtBr na presença de inibidores de efluxo e glucose a 0,4%. As concentrações de IEs (μ g/mL) estão indicadas entre parêntesis retos []. Legenda: VP – Verapamil; TZ - Tioridazina; CPZ - Clorpromazina; PA β N - “Phe-arg β -naphthylamide dihydrochloride”, G – glucose.

Na presença da glucose 0,4%, observa-se que o efeito do PA β N no efluxo de EtBr é idêntico ao observado na ausência de glucose, para os três isolados e estirpe de referência ATCC19606^T. Os inibidores com maior efeito na acumulação de EtBr são igualmente o VP, TZ e CPZ. O isolado AB-2 é o que apresenta maior capacidade de efluxo, seguindo-se o isolado AB-3. O isolado AB-1 e estirpe ATCC19606^T não apresentam efluxo significativo. Estes resultados estão em concordância com os anteriores.

3.3 Avaliação da atividade dos inibidores de bombas de efluxo através da determinação de concentrações mínimas inibitórias

3.3.1 Determinação das concentrações mínimas inibitórias dos antibióticos para os isolados AB-1, AB-2, AB-3 e estirpe de referência ATCC19606^T

A CMI define-se como a menor concentração do composto antimicrobiano capaz de inibir o crescimento visível de um microrganismo (126). As CMIs para os inibidores de efluxo em estudo e EtBr foram já determinados no ponto 3.2.2 (Resultados). O resultado das CMIs dos antibióticos para os isolados AB-1, AB-2, AB-3 e estirpe ATCC19606^T, assim como o respetivo perfil de suscetibilidade estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15 – Determinação dos valores de CMIs para os antibióticos nos três isolados e estirpe de referência ATCC19606^T.

Classe /ATB	ATCC19606 ^T		AB-1		AB-2		AB-3	
	CMI (µg/mL)	S/I/R	CMI (µg/mL)	S/I/R	CMI (µg/mL)	S/I/R	CMI (µg/mL)	S/I/R
Aminoglicosídeos								
AK ¹	4	S	1024	R	>1024	R	>1024	R
Carbapenemos								
MER ¹	16	I	128	R	64	R	128	R
Macrólidos								
CLA ²	64	N/A	512	N/A	>512	N/A	>512	N/A
ERI ²	64	N/A	256	N/A	>1024	N/A	512	N/A
Quinolonas								
CIP ¹	2	R	512	R	1024	R	512	R
Tetraciclinas								
TE ³	2	S	1024	R	1024	R	1024	R
Outros								
RD ²	4	NA	2	NA	4	N/A	4	N/A
COL ¹	2	S	2	S	32	R	64	R

CMI – Concentração mínima inibitória; R- Resistente; I – Intermédio; S- Suscetível. N/A – não aplicável. ¹ Segundo os critérios definidos pelo EUCAST (2014). ² Não existem critérios de interpretação definidos para estes antibióticos. ³ Segundo os critérios definidos pelo CLSI (2013). AK - Amicacina, CIP- Ciprofloxacina, CLA - Claritromicina, COL - Colistina, ERI - Eritromicina, MER -Meropenem, RD - Rifampicina, TE – Tetraciclina.

Pela análise da Tabela 15, verifica-se que a estirpe de referência ATCC19606^T é suscetível para todos os antibióticos testados com critérios de interpretação definidos, com exceção do meropenem (suscetibilidade intermédia) e ciprofloxacina (resistente). Os isolados AB-1, AB-2 e AB-3 são resistentes a todos os antibióticos testados, confirmando a suspeita de se tratarem de isolados MDR e XDR. Para os macrólidos (claritromicina e eritromicina), embora não existam critérios de interpretação definidos, as CMIs apresentadas são bastante elevadas em comparação com as da estirpe de referência ATCC19606^T. A amicacina, tetraciclina e ciprofloxacina apresentam as CMIs mais elevadas para os três isolados em estudo.

3.3.2 Determinação das concentrações mínimas inibitórias dos antibióticos e EtBr na presença de inibidores de efluxo para os isolados AB-1, AB-2, AB-3 e estirpe de referência ATCC19606^T

Para avaliar a capacidade de diminuição da CMI pelos IEs em estudo, determinaram-se as CMIs na ausência e na presença destes compostos, para os isolados e estirpe de referência ATCC19606^T. Os IEs foram utilizados em concentrações sub-inibitórias, para cada isolado, para garantir que o efeito demonstrado se deve ao sinergismo entre o antibiótico e o IE e não devido à ação deste sobre a célula bacteriana: VP e CPZ a $\frac{1}{4}$ da CMI; TZ a $\frac{1}{4}$ da CMI, com exceção para o isolado AB-3, cuja concentração utilizada foi $\frac{1}{8}$ da CMI; NMP a $\frac{1}{64}$ da CMI; CCCP a $\frac{1}{16}$ da CMI e PA β N a $\frac{1}{8}$ da CMI. Em todos os ensaios, o EtBr foi utilizado como substrato de referência de sistemas de efluxo. A partir dos valores de CMIs obtidos na presença/ausência dos IEs, foi calculado, o fator de modulação (FM), como se descreve no ponto 2.2.3 (Material e Métodos). O valor do FM reflete a redução do valor da CMI de um dado antibiótico na presença de um IE e é proporcional à “força inibitória” do inibidor (103,117). Os resultados obtidos estão apresentados na Tabelas 16 e 17.

Tabela 16 - Valores de CMI's para a amicacina, meropenem, claritromicina, eritromicina e EtBr na ausência e presença dos Inibidores de efluxo e Fator de Modulação.

ATB/ ATB + IE	ATCC19606 ^T		AB-1		AB-2		AB-3	
	CMI (µg/mL)	FM	CMI (µg/mL)	FM	CMI (µg/mL)	FM	CMI (µg/mL)	FM
EtBr	512		1024		1024		1024	
+VP	512	1 (=)	512	2 (↓)	8	128 (↓)	128	8 (↓)
+TZ	512	1 (=)	128	8 (↓)	256	4 (↓)	512	2 (↓)
+CPZ	512	1 (=)	128	8 (↓)	512	2 (↓)	256	4 (↓)
+NMP	512	1 (=)	512	2 (↓)	1024	1 (=)	512	2 (↓)
+CCCP	256	2 (↓)	512	2 (↓)	512	2 (↓)	512	2 (↓)
+ PAβN	256	2 (↓)	128	8 (↓)	256	4 (↓)	128	8 (↓)
AK	4		1024		>1024		>1024	
+VP	4	1 (=)	>1024	1 (=)	1024	1 (=)	>1024	1 (=)
+TZ	4	1 (=)	1024	1 (=)	128	≥8 (↓)	>1024	1 (=)
+CPZ	8	1(=)	>1024	1 (=)	>1024	1 (=)	>1024	1 (=)
+NMP	8	1 (=)	8	128 (↓)	128	≥8 (↓)	8	≥128 (↓)
+CCCP	16*	4* (↑)	4	256 (↓)	64	≥16 (↓)	4	≥256 (↓)
+ PAβN	0,125	32 (↓)	>1024	1 (=)	>1024	1 (=)	>1024	1 (=)
MER	16		128		64		128	
+VP	2	8 (↓)	128	1 (=)	8	8 (↓)	128	1 (=)
+TZ	2	8 (↓)	128	1 (=)	64	1 (=)	>512	≥4 (↑)
+CPZ	4	4 (↓)	64	2 (↓)	128	2* (↑)	128	1 (=)
+NMP	>8	1 (=)	32	4 (↓)	32	2 (↓)	256	2
+CCCP	>8	1 (=)	2	64 (↓)	64	1 (=)	2	64 (↓)
+ PAβN	8	2 (↓)	>512*	≥4* (↑)	>512*	≥8* (↑)	>512	≥4 (↑)
CLA	64		512		>512		>512	
+VP	64	1 (=)	512	1 (=)	512	1 (=)	>512	>1 (=)
+TZ	32	2 (↓)	256	2 (↓)	512	1 (=)	512	1 (=)
+CPZ	64	1 (=)	256	2 (↓)	>512	>1 (=)	512	1 (=)
+NMP	32	2 (↓)	2	256 (↓)	16	≥32 (↓)	4	≥128 (↓)
+CCCP	16	4 (↓)	2	256 (↓)	64	≥8 (↓)	2	≥256 (↓)
+ PAβN	4	16 (↓)	8	64 (↓)	64	≥8 (↓)	8	≥64 (↓)
ERI	64		256		>1024		512	
+VP	64	1 (=)	512	2* (↑)	512	≥2 (↓)	1024	2* (↑)
+TZ	32	2 (↓)	256	1 (=)	512	≥2 (↓)	1024	2* (↑)
+CPZ	64	1 (=)	8	32 (↓)	1024	>1 (=)	1024	2* (↑)
+NMP	32	2 (↓)	4	64 (↓)	128	≥8 (↓)	8	64 (↓)
+CCCP	32	2 (↓)	4	64 (↓)	64	≥16 (↓)	4	128 (↓)
+ PAβN	1	64 (↓)	64	4 (↓)	64	≥16 (↓)	16	32 (↓)

ATB – antibiótico; EtBr – Brometo de etídio; IE – inibidor de efluxo; FM – fator de modulação; CMI – Concentração mínima inibitória; AK - Amicacina, CLA - Claritromicina, ERI - Eritromicina, MER –Meropenem, VP – Verapamil; TZ - Tioridazina; CPZ - Clorpromazina; NMP - “1-(1-naphthylmethyl)-piperazine”; PAβN - “Phe-arg β-naphthylamide dihydrochloride”; CCCP - Carbonil cianeto *m*-clorofenilhidrazona. *Interação antagonista.

Tabela 17 - Valores de CMIs para a ciprofloxacina, tetraciclina, rifampicina e colistina na ausência e presença dos Inibidores e efluxo e Fator de Modulação.

ATB / ATB + IE	ATCC19606 ^T		AB-1		AB-2		AB-3	
	CMI (µg/mL)	FM	CMI (µg/mL)	FM	CMI (µg/mL)	FM	CMI (µg/mL)	FM
CIP	2		512		1024		512	
+VP	2	1 (=)	1024	2* (↑)	256	4(↓)	>2048	≥4* (↑)
+TZ	1	2 (↓)	512	1 (=)	2048	2* (↑)	>2048	≥4* (↑)
+CPZ	2	1 (=)	16	32 (↓)	2048	2* (↑)	>2048	≥4* (↑)
+NMP	2	1 (=)	64	8 (↓)	128	8 (↓)	32	16 (↓)
+CCCP	1	2 (↓)	16	32 (↓)	128	8 (↓)	16	32 (↓)
+ PAβN	1	2(↓)	512	1 (=)	512	2 (↓)	256	2 (↓)
TET	2		1024		1024		1024	
+VP	2	1 (=)	512	2 (↓)	1024	1 (=)	1024	1 (=)
+TZ	1	2 (↓)	512	2 (↓)	1024	1 (=)	1024	1 (=)
+CPZ	2	1 (=)	64	16 (↓)	1024	1 (=)	1024	1 (=)
+NMP	1	2 (↓)	256	4 (↓)	256	4 (↓)	256	4 (↓)
+CCCP	1	2 (↓)	32	32 (↓)	256	4 (↓)	128	8 (↓)
+ PAβN	2	1 (=)	256	4 (↓)	256	4 (↓)	256	4 (↓)
RD	4		2		4		4	
+VP	4	1 (=)	2	1 (=)	≤0,0156	≥ 256 (↓)	4	1 (=)
+TZ	2	2 (↓)	4	2* (↑)	4	1 (=)	2	2 (↓)
+CPZ	4	1 (=)	1	2(↓)	4	1 (=)	2	2 (↓)
+NMP	1	4 (↓)	≤0,25	≥ 4 (↓)	0,5	8 (↓)	0,0625	64 (↓)
+CCCP	0,5	8 (↓)	0,0312	64 (↓)	0,5	8 (↓)	0,0312	128 (↓)
+ PAβN	≤0,0156	≥ 256	≤0,0156	≥ 256 (↓)	0,0312	128 (↓)	≤0,0156	≥ 256 (↓)
COL	2		2		32		64	
+VP	≤0,0078	≥ 256 (↓)	0,25	8 (↓)	≤0,0078	≥ 4102 (↓)	2	32 (↓)
+TZ	≤0,0078	≥ 256 (↓)	≤0,0078	≥ 256 (↓)	≤0,0078	≥ 4102 (↓)	8	8 (↓)
+CPZ	0,125	16 (↓)	≤0,0078	≥ 286 (↓)	2	16 (↓)	4	16 (↓)
+NMP	0,5	4 (↓)	0,125	16 (↓)	8	4 (↓)	32	2 (↓)
+CCCP	≤0,0078	≥ 256 (↓)	0,0312	64 (↓)	0,0625	512 (↓)	0,5	128 (↓)
+ PAβN	16	8*(↑)	8	4*(↑)	32	1 (=)	512*	8*(↑)

ATB – antibiótico; EtBr – Brometo de etídio; IE – inibidor de efluxo; FM – fator de modulação; CMI – Concentração mínima inibitória; CIP – ciprofloxacina; TE – tetraciclina, RD – rifampicina, COL – colistina; VP – Verapamil; TZ - Tioridazina; CPZ - Clorpromazina; NMP - “1-(1-naphthylmethyl)-piperazine”; PAβN - “Phe-arg β-naphthylamide dihydrochloride”; CCCP - Carbonil cianeto *m*-clorofenilhidrazona. *Interação antagonista.

Pela análise dos resultados obtidos na Tabela 16, verificamos que a CMI do substrato de efluxo EtBr não decresce significativamente para a estirpe ATCC19606^T, pois considerou-se significativo um valor de FM ≥4 (diminuição da CMI em pelo menos duas diluições), confirmando o seu efluxo basal. No caso do isolado AB-1, apenas o CPZ, TZ e PAβN reduziram a CMI do EtBr em quatro diluições (FM=8). Para o isolado AB-2, houve um decréscimo muito significativo da CMI do EtBr na adição de

VP (FM=128), menos visível na presença de TZ e PAβN (FM=4). Os IEs com maior efeito na redução da CMI do EtBr no caso do isolado AB-3 são o VP (FM=8), CPZ (FM=4) e PAβN (FM=8).

Para a estirpe ATCC19606^T, apenas o PAβN foi o inibidor que provocou um decréscimo significativo da CMI para a amicacina (FM=32); contrariamente, todos os isolados em estudo apresentaram diminuição significativa da CMI da amicacina pelo NMP e CCCP: i) isolado AB-1, NMP (FM=128) e CCCP (FM=256); ii) isolado AB-2, NMP (FM≥8) e CCCP (FM≥16) e iii) isolado AB-3, NMP (FM≥128) e CCCP (FM≥256).

No caso do meropenem, para a estirpe ATCC19606^T os IEs responsáveis por um decréscimo significativo da CMI foram o VP e TZ (FM=8) e CPZ (FM=4). No entanto, a CMI para este antibiótico não foi significativamente alterada para os outros isolados em estudo, com exceção do VP, NMP e CCCP. Para o isolado AB-1, obteve-se um FM de 4 para o NMP e FM=64 para o CCCP. Este IE foi também o único que teve efeito na CMI do meropenem para o isolado AB-3 (FM=64). Para o isolado AB-2, o VP foi o único IE com influência no valor da CMI (FM=8).

Para os macrólidos (eritromicina e claritromicina), verificou-se que os IEs com maior efeito na diminuição da CMI para estes antibióticos são o NMP, CCCP e PAβN. Apenas no caso da estirpe de referência ATCC19606^T tal não se verificou, havendo uma diminuição menos significativa para a CMI da claritromicina com CCCP (FM=4) e PAβN (FM=16), e CMI da eritromicina com PAβN (FM=64), do que a observada nos isolados em estudo. Para a claritromicina, os valores de FM obtidos foram os mais elevados no caso do isolado AB-1 para o NMP e CCCP (FM=256), seguidos pelo PAβN (FM=64); para o isolado AB-2, o NMP foi o IE que provocou maior decréscimo da CMI (FM≥32), seguido pelo CCCP e PAβN (FM≥8); e para o isolado AB-3, o CCCP foi o IE com maior efeito na CMI (FM≥256), seguindo-se o NMP (FM≥128) e PAβN (FM≥64). A CMI para a eritromicina para o isolado AB-1 apresenta o maior valor de FM na presença do CCCP (FM=128), NMP (FM=64) e PAβN (FM=32).

A CMI da ciprofloxacina para a estirpe de referência ATCC19606^T não foi significativamente afetada pelos IEs em estudo. O NMP e CCCP foram os inibidores que causaram maior efeito na redução da CMI para este antibiótico, para os isolados em

estudo. No isolado AB-1, no entanto, o CPZ (FM=32) apresentou um efeito idêntico ao do CCCP (FM=32), seguindo-se o NMP (FM=8). O NMP e CCCP reduziram a CMI da ciprofloxacina em 8 vezes, para o isolado AB-2, sendo que neste isolado, o VP foi o único a demonstrar efeito significativo na CMI (FM=4). O VP demonstrou o efeito contrário para os isolados AB-1 e AB-3, aumentando o valor da CMI da ciprofloxacina. Apenas os inibidores de efluxo NMP e CCCP foram eficazes na redução da CMI em 16 e 32 vezes, respetivamente.

Para a tetraciclina, o NMP, CCCP e PAβN foram os IEs com maior efeito na redução da CMI deste antibiótico nos isolados AB-1, AB-2 e AB-3. A CMI permaneceu inalterada na estirpe de referência ATCC19606^T. O NMP e PAβN reduziram a CMI em quatro vezes, para os três isolados. O CCCP apresentou uma igual redução de quatro vezes do valor da CMI no isolado AB-2, sendo mais eficaz no isolado AB-1 (FM=32) e isolado AB-3 (FM=8). VP, TZ e CPZ não apresentaram qualquer efeito nos isolados e estirpe de referência em estudo, com exceção do CPZ para o isolado AB-1 (FM=16).

Do mesmo modo, o NMP, CCCP e PAβN são também os IEs mais eficazes na redução da CMI para a rifampicina, desta vez, nos três isolados e estirpe de referência em estudo. O PAβN foi o inibidor mais eficaz para a estirpe de referência e isolado AB-3, com uma descida da CMI igual ou superior a 256 vezes; para os isolados AB-1 e AB-2 a redução foi igual ou superior a 256 e de 128 vezes, respetivamente. O CCCP foi o segundo inibidor com maior efeito, com uma redução da CMI em 128 vezes para o isolado AB-2, 64 vezes para o isolado AB-1 e oito vezes para o isolado AB-2 e estirpe de referência. O NMP teve um efeito idêntico nas CMIs da estirpe de referência e do isolado AB-1 (FM≥4), menor no isolado AB-2 (FM=8) e maior na CMI do isolado AB-3 (FM=64).

Por fim, o efeito dos IEs nas CMIs da colistina para os isolados e estirpe de referência em estudo foi diferente e surpreendente, sendo que VP e TZ os mais eficazes na redução das CMIs, seguindo-se o CPZ, CCCP e NMP. O VP e TZ foram os IEs mais eficazes na redução da CMI deste antibiótico no isolado AB-2 (FM≥4102), seguidos pelo CCCP (FM=512), CPZ (FM=16) e NMP (FM=4). Para a estirpe de referência, observa-se que o VP, TZ e CCCP foram os mais IEs eficazes (FM≥256), seguidos pelo CPZ (FM=16) e por último, o NMP (FM=4). O NMP foi o IE menos eficaz na redução da CMI da colistina da estirpe de referência (FM=4), dos isolados AB-2 (FM=4) e AB-3

(FM=2), com exceção do isolado AB-1 (FM=16). Neste isolado, não se verificou um efeito do VP na CMI da colistina (FM=8) equiparável ao observado nos isolados AB-2 (FM \geq 4102), AB-3 (FM=32) e estirpe de referência ATCC19606^T (FM \geq 256).

O PA β N não teve qualquer efeito sinérgico na CMI da colistina em qualquer das estirpes em estudo, tendo pelo contrário evidenciado claro antagonismo com a colistina, uma vez que as CMIs para este antibiótico foram aumentadas na sua presença exceto no caso do isolado AB-2, em que não se verificou qualquer efeito.

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

4.1 Análise do perfil de suscetibilidade aos antibióticos dos isolados clínicos AB-1, AB-2 e AB-3 e estirpe de referência ATCC19606^T

Pela observação da Tabela 9 do ponto 3.1.1 (Resultados), verifica-se que os isolados clínicos de *A. baumannii* em estudo apresentam uma menor suscetibilidade aos antibióticos testados em relação à estirpe de referência ATCC19606^T. Pelos critérios de suscetibilidade definidos para *A. baumannii* (31), esta estirpe de referência e os três isolados clínicos em estudo são classificados como MDR pois são resistentes a um ou mais antibióticos de menos três classes diferentes e igualmente XDR, pois são resistentes a um ou mais antibióticos de todas as classes, menos duas categorias de antibióticos (31). O perfil de resistência MDR apresentado pelos isolados em estudo pela técnica de difusão de disco em meio sólido foi confirmado pela determinação das CMIs em meio líquido, justificando a estabilização destes fenótipos de resistência, muito provavelmente pela pressão seletiva aos antibióticos normalmente utilizados no tratamento das infecções causadas por *A. baumannii*, como por exemplo os carbapenemos, aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, tetraciclina e cefalosporinas (7,19,32,33). Observando-se a Tabela 15 do ponto 3.3.1 (Resultados), podemos constatar que AB-2 e AB-3 são resistentes a todos os antibióticos testados incluindo os macrólidos, grupo que não é normalmente utilizado no tratamento destas infecções (7,32,33). Este grupo de antibióticos não fez parte da prescrição terapêutica reportada para este doente, mas os três isolados apresentam valores de CMI muito superiores aos apresentados pela estirpe de referência ATCC19606^T, indicando que a resistência neste grupo pode ter sido associada à aquisição de resistência a outros grupos de antibióticos – um fenómeno típico da aquisição de resistência por aumento da capacidade de efluxo (80,132).

Assim, o fenótipo MDR apresentado pelos três isolados de *A. baumannii* em estudo poderá dever-se a um mecanismo de resistência, comum aos três isolados, sugerindo-se o efluxo como um dos mecanismos que claramente contribui para o nível

de resistência aos antibióticos observado, assim como a resistência alargada a algumas classes de antibióticos, como são exemplo os macrólidos (claritromicina e eritromicina).

Os isolados clínicos M/XDR de *A. baumannii* estudados neste trabalho apresentaram diferenças no perfil de suscetibilidade à colistina. AB-1 é suscetível a este antibiótico, à semelhança da estirpe de referência, enquanto que AB-2 e AB-3 são resistentes (com crescente valor de CMI). A resistência à colistina em *A. baumannii* é emergente e de rápida disseminação (35,38), e como referido anteriormente, já reportada em vários países europeus, com maior incidência nos países do sul da Europa (34,38,39). Esta variabilidade do perfil de suscetibilidade apresentada pelos isolados clínicos sequenciais em estudo pode explicar-se pelo fenómeno de heteroresistência, devido à variabilidade genética e fenotípica numa mesma população de *A. baumannii* (41–46). A presença simultânea de isolados clínicos sequenciais *A. baumannii* MDR do mesmo doente com diferentes perfis de suscetibilidade à colistina estará certamente relacionada com a pressão seletiva derivada da administração terapêutica de colistina ou de outras polimixinas (28), a que este doente foi sujeito a partir do momento em que se detetou o fenótipo MDR no isolado AB-1.

4.2 Avaliação da contribuição dos sistemas de efluxo para o desenvolvimento de fenótipos de multirresistência em isolados clínicos de *A. baumannii*

Com o objetivo de avaliar o contributo da atividade de efluxo dos isolados de *A. baumannii* em estudo no desenvolvimento da multirresistência aos antibióticos, foram aplicados dois métodos para a deteção direta do efluxo em bactérias: método de “Cartwheel” (75,111,113) e método fluorométrico semi-automático em tempo real (114,115), ambos baseados no efluxo de EtBr (substrato comum de bombas de efluxo). Adicionalmente, realizou-se uma avaliação indireta da atividade de efluxo dos isolados, através da determinação de concentrações mínimas inibitórias na presença e ausência de compostos IEs.

Para a deteção preliminar da atividade de efluxo, aplicou-se o método de “Cartwheel” em placa de agar, que é um método pouco rigoroso mas simples e pouco dispendioso, que permitiu, nos isolados clínicos M/XDR em estudo, o rastreio inicial da presença de efluxo, e, através da sua comparação com o efluxo intrínseco/basal demonstrado pela estirpe de referência, detetar e demonstrar uma atividade de efluxo aumentada, possivelmente, devido à sobreexpressão de BEs. Confirmou-se esta hipótese através dos ensaios de fluorometria em tempo real. Este método, mais fino e laborioso, que está dependente de equipamentos especializados para a sua realização, permitiu, após a otimização do protocolo de trabalho, confirmar os resultados obtidos pelo método de “Cartwheel”. Adicionalmente, este método permitiu determinar a concentração máxima de EtBr que as células bacterianas conseguem efluxar antes de ocorrer acumulação intracelular observável deste substrato, ou seja, a concentração de equilíbrio de EtBr, durante 30 minutos. Este valor dá-nos uma medida precisa da capacidade de efluxo de uma estirpe e é com base nele que podemos avaliar a eficácia dos IEs em deslocarem este equilíbrio de influxo/efluxo de EtBr, no sentido de uma maior retenção no interior das células pela sua capacidade de inibição do efluxo em tempo-real deste substrato.

Por fim, para complementar os resultados obtidos e as indicações obtidas sobre os IEs na sua capacidade de potenciar a retenção de substratos efluxáveis, efetuou-se a determinação das CMIs dos antibióticos, na presença e ausência dos IEs. Tal permitiu

avaliar a atividade de efluxo dos antibióticos nos isolados clínicos em estudo e correlacionar estes resultados com os obtidos para a inibição do efluxo de EtBr (113). Para tal determinou-se a CMI do EtBr nas mesmas condições, por ser um substrato de efluxo comum à maioria das bombas de efluxo descritas em *A. baumannii*, possivelmente envolvidas na resistência aos antibióticos (20,61,96).

A determinação das CMIs de EtBr, enquanto substrato universal de efluxo, forneceu uma clara indicação do efeito dos IEs no efluxo, ao passo que o decréscimo das CMIs dos antibióticos na presença de IEs poderá dever-se a vários fatores associados, como as diferenças de substrato preferencial dos sistemas de efluxo, suscetibilidade desses sistemas de efluxo aos IEs utilizados e aos efeitos causados ao nível celular, ainda por esclarecer.

4.2.1 Detecção da atividade de efluxo nos isolados AB-1, AB-2, AB-3 e estirpe de referência ATCC19606^T

A atividade dos sistemas de efluxo em *A. baumannii* é frequentemente inferida a partir das CMIs dos antibióticos, assim como os níveis de expressão das BE. Assim sendo, é importante utilizar técnicas de avaliação direta do efluxo em *A. baumannii*, como os métodos fluorométricos em tempo real, para avaliar a contribuição da atividade dos sistemas de efluxo na acumulação e suscetibilidade aos antibióticos (112). A otimização e aplicação das metodologias para avaliação direta da atividade de efluxo nos isolados MDR de *A. baumannii* foi essencial para atingir os objetivos propostos nesta dissertação, verificando-se que os isolados clínicos sequenciais MDR de *A. baumannii* apresentam efluxo ativo e atividade de efluxo aumentada, em comparação com a estirpe de referência ATCC19606^T.

Através da análise dos resultados obtidos pelo método de “Cartwheel”, foi possível verificar que tanto a estirpe de referência como os três isolados em estudo apresentam atividade de efluxo. Adicionalmente, a fluorescência emitida pelos isolados clínicos AB-2 e AB-3 foi observada em altas concentrações de EtBr, o que demonstra uma capacidade de efluxo aumentada quando comparada com a estirpe de referência ATCC19606^T, que apresenta uma atividade de efluxo considerada basal. O efeito da temperatura também comprova a presença de efluxo ativo, sendo a atividade das BE em

A. baumannii potenciada a cerca de 37°C, que é igualmente a temperatura ideal de crescimento para esta espécie.

A capacidade aumentada do efluxo de EtBr no isolado AB-2 ($MC_{EtBr} = 2 \mu\text{g/mL}$) foi confirmada pelos resultados obtidos nos ensaios de fluorometria em tempo real. Nos ensaios de acumulação na presença de IEs, confirmou-se a presença de atividade de efluxo de EtBr em todos os isolados e estirpe de referência em estudo, através da visualização da entrada/saída de EtBr das células. Observou-se inibição da atividade de efluxo, ou seja, maior retenção deste substrato no interior da célula, na presença de todos os IEs em estudo. É de salientar o efeito dos inibidores VP, TZ, CPZ e PA β N, que, de um modo geral, proporcionaram a maior retenção de EtBr para todos os isolados e estirpe de referência. A capacidade de retenção de EtBr foi maior no isolado AB-2, quando comparada com a estirpe de referência e isolados AB-1 e AB-3, o que está de acordo com os resultados obtidos na avaliação preliminar da atividade de efluxo pelo método de “Cartwheel”.

Embora o PA β N tenha sido um dos inibidores com maior efeito observado na acumulação de EtBr, tal não se verificou nos ensaios de efluxo na presença de IEs, tal como esperado, pois trata-se de um inibidor competitivo direto dos substratos de BEs, ao contrário dos restantes inibidores, que atuam preferencialmente na inibição da energia disponível para o efluxo, e, como tal, o seu efeito é duradouro. A exposição ao PA β N, com mecanismo de ação idêntico ao dos péptidos catiónicos como as polimixinas, poderá igualmente causar alterações da permeabilidade celular. Estas podem levar à rutura da parede celular, incapacitando a célula na retenção de EtBr, que só emite fluorescência quando ligado. Deste modo, o efeito do PA β N em todos os isolados e estirpe de referência deve-se à associação entre o efeito de competição com o substrato de efluxo e a alteração da permeabilidade celular.

Os inibidores VP, TZ, CPZ e PA β N confirmaram ser os IEs com maior efeito na retenção de EtBr em *A. baumannii*, tanto pela observação dos gráficos como pelo cálculo da fluorescência relativa final. Mais uma vez, a capacidade significativamente aumentada de retenção de EtBr na presença destes três inibidores foi demonstrada no isolado AB-2, a par de uma maior evidência de efluxo, confirmada pelos valores de FFR obtidos serem significativamente superiores aos obtidos nos outros isolados e estirpe de referência. O isolado AB-3 apresenta, nestes ensaios, uma atividade de efluxo

superior à do isolado AB-1 e estirpe de referência. Observando-se os valores de FFR para este isolado, verificamos que a adição de uma fonte energética, glucose a 0,4%, potencia a acumulação de EtBr na presença de VP, TZ, CPZ e PAβN. Por outro lado, a atividade de efluxo do isolado AB-2 não é influenciada pela adição de glucose, o que pressupõe que as BEs neste isolado não dependam tanto de uma fonte energética para o aumento da sua atividade, o que é entendido como um sinal de extensa sobreexpressão de BE neste isolado.

4.2.2 Influência dos compostos inibidores de efluxo na determinação das concentrações mínimas inibitórias dos antibióticos e EtBr

A influência dos inibidores de efluxo nas CMI's para os antibióticos e EtBr permitiu uma avaliação indireta da atividade de efluxo e a sua comparação com os resultados obtidos anteriormente, nos métodos de detecção direta da atividade de efluxo, correlacionando-se os efeitos inibitórios observados com a suscetibilidade aos antibióticos nos três isolados de *A. baumannii* em estudo (73,113).

Como se observou nos ensaios de fluorometria em tempo real, os IEs que melhor proporcionaram a acumulação intracelular de EtBr nos isolados e na estirpe ATCC19606^T foram o VP, as fenotiazinas TZ e CPZ e o PAβN. No entanto, na estirpe de referência a CMI do EtBr não sofreu alterações quando determinada na presença destes cinco IEs, pelo que se pressupõe que, tal como verificado anteriormente, esta estirpe possua uma menor atividade de efluxo, considerada basal e de referência, quando comparada com os isolados clínicos em estudo. As fenotiazinas proporcionaram um decréscimo significativo da CMI do EtBr no isolado AB-1, sendo menos significativo para os isolados AB-2 e AB-3. Por sua vez, o PAβN foi eficaz na redução da CMI deste substrato para os três isolados em estudo. O VP apresentou um efeito muito significativo no caso do isolado AB-2 (FM=128) e menos significativo no isolado AB-3.

Como referido anteriormente, o EtBr é um substrato comum às BEs de *A. baumannii* envolvidas no efluxo de uma grande variedade de substratos, incluindo os antibióticos utilizados no tratamento destas infeções, que contribuem para a multirresistência (73,75–78). Tendo sido utilizado nos três ensaios de avaliação do

efluxo, direta e indireta, permitiu correlacionar os resultados obtidos e fornecer uma melhor indicação sobre a atividade de efluxo e a sua contribuição para a resistência aos antibióticos nos isolados clínicos de *A. baumannii* em estudo, assim como da estirpe de referência *A. baumannii* ATCC19606^T.

Salienta-se que o isolado AB-2 apresentou a maior atividade de efluxo nos ensaios fluorométricos, seguindo-se o isolado AB-3 e por fim o isolado AB-1. A aparente suscetibilidade deste isolado à ação do VP no caso da ciprofloxacina e rifampicina pode considerar-se uma consequência inevitável da atividade aumentada dos sistemas de efluxo, neste isolado.

As fenotiazinas, TZ e CPZ, embora tenham sido dos IEs mais eficazes na retenção e efluxo de EtBr, apenas o CPZ apresentou um efeito pontual no decréscimo da CMI da ciprofloxacina (FM=32) e tetraciclina (FM=16), somente no isolado AB-1. As fenotiazinas, agentes anti-psicóticos e anti-histamínicos, possuem atividade antimicrobiana reconhecida, embora o seu mecanismo de ação ainda não esteja bem esclarecido (106,110).

O NMP, agonista da serotonina, que não demonstrou muito ser eficaz nos ensaios fluorométricos, demonstrou, no entanto, ser bastante eficaz na redução das CMIs para vários antibióticos, embora não tenha tido qualquer efeito na CMI do EtBr. O decréscimo das CMIs foi particularmente significativo nos isolados AB-1 e AB-3: para a amicacina (FM_{AB-1}=128; FM_{AB-3}≥128) para os macrólidos, eritromicina (FM_{AB-1}=64; FM_{AB-2}=64) e claritromicina (FM_{AB-1}=256; FM_{AB-3}=128). Também no isolado AB-2 o decréscimo das CMIs para os mesmos antibióticos foi significativo, embora menos marcante.

Igualmente, o inibidor de efluxo CCCP demonstrou ter a capacidade de reduzir significativamente as CMIs da amicacina, meropenem, macrólidos (eritromicina e claritromicina), rifampicina, ciprofloxacina, tetraciclina e colistina. Estes resultados estão de acordo com a influência deste IE reportada por Xing *et al.* (20), em que as CMIs para fluoroquinolonas, amicacina e carbapenemos foram reduzidas significativamente na presença deste IE. Não se observou qualquer efeito na CMI do EtBr. Estes inibidores, NMP e CCCP, sendo compostos desacopladores, interferem com o nível energético da membrana bacteriana e têm uma grande capacidade de reduzir a viabilidade e causar morte celular pela dissipação da força-protônica motriz membranar

(99). Assim sendo, é questionável se a penetração intracelular do antibiótico se deve ao efeito inibitório destes IEs no efluxo ou à morte celular.

O PA β N, composto péptido-mimético, foi um dos IEs que proporcionou maior acumulação de EtBr nos ensaios fluorométricos. Este inibidor de efluxo de largo espectro tem como mecanismo de ação proposto a competição com os substratos alvo das BE (20,89), atuando também como permeabilizante da membrana plasmática (100). O PA β N demonstrou atividade inibitória tanto para os isolados clínicos de *A. baumannii* como para a estirpe de referência: macrólidos, rifampicina e tetraciclina. O efeito deste IE na redução das CMIs da clindamicina está de acordo com o descrito na literatura para *A. baumannii* (101). Contrariamente ao descrito para *Pseudomonas aeruginosa*, não se verificou qualquer efeito nas CMIs para a ciprofloxacina (100); e no caso do meropenem, em que se verificou aumento das CMIs para os três isolados clínicos em estudo. Estes resultados suportam a literatura: o efeito competitivo do PA β N em relação aos substratos de efluxo varia consoante o antibiótico e a BE envolvida (89). No entanto, à semelhança do se propôs anteriormente nos ensaios de efluxo de EtBr, é possível que este efeito nas CMIs seja devido a alterações da permeabilidade membranar, causadas por este inibidor, mesmo quando utilizado em baixas concentrações (100).

Os resultados obtidos para a colistina serão discutidos separadamente nesta seção, dada a sua importância e significância para a hipótese de trabalho proposta nesta dissertação. A atribuição do efluxo como mecanismo de resistência às polimixinas em geral não é descrito ou evidenciado na literatura, e em particular para *A. baumannii*, sendo um tópico controverso (71,72). Estes péptidos catiónicos interferem diretamente com o lípido A do LPS da ME bacteriana e causam morte celular (37,39). A colistina foi incluída no painel de antibióticos em estudo neste trabalho devido à sua importância como antibiótico de último recurso no tratamento das infeções causadas por isolados clínicos MDR de *A. baumannii*, tendo sido o último recurso terapêutico utilizado no tratamento do doente de onde foram isolados sequencialmente AB-1, AB-2 e AB-3. Não sendo o efluxo um mecanismo de resistência descrito para este antibiótico, não era esperado que todos os IEs em estudo, com exceção do PA β N, proporcionassem um decréscimo significativo das CMIs da colistina para todos os isolados e estirpe de

referência, com especial ênfase no isolado AB-2, na presença de VP e TZ (FM \geq 4102). De importância para a compreensão do processo de aquisição sequencial de resistência à colistina, o isolado AB-3 é o que apresenta menor redução da CMI da colistina na presença destes IEs, sendo que o efeito mais significativo observa-se em AB-1 e sobretudo em AB-2 quando se instala a resistência fenotípica à colistina. Devido ao mecanismo de ação da colistina e aos efeitos de permeabilização e citotoxicidade que estes IEs em estudo exercem ao nível celular, pressupõe-se que o decréscimo das CMIs apresentado seja resultante da ação conjunta e sinérgica deste antibiótico com os vários inibidores.

Adicionalmente, o PA β N apresentou o efeito contrário: um severo aumento das CMIs da colistina. Como o mecanismo de ação da colistina, péptido catiónico e do PA β N, péptido-mimético, são idênticos (ambos permeabilizam a membrana externa bacteriana), supõe-se que estes resultados se devam à competição do PA β N como substrato em relação à colistina, levando ao antagonismo entre estes compostos. Desde modo, as BEs reconhecem preferencialmente o PA β N como substrato de efluxo, em detrimento da colistina, levando à necessidade de uma maior concentração deste antibiótico para exercer a sua ação sobre a célula bacteriana.

Como referido anteriormente, os três isolados clínicos MDR de *A. baumannii* estudados neste trabalho apresentam evidências claras de uma atividade de efluxo aumentada, comparativamente à da estirpe de referência *A. baumannii* ATCC19606^T. O primeiro isolado clínico, AB-1, não difere de forma muito significativa da estirpe de referência, apresentando várias semelhanças na capacidade de acumulação na presença de IEs/efluxo de EtBr e na influência dos IEs na resistência aos antibióticos. O isolado AB-1 é o que apresenta menor atividade de efluxo, dos três isolados em estudo. O isolado AB-2, de um posterior isolamento clínico, obteve resultados concordantes em todos os ensaios: foi o isolado clínico que demonstrou a maior atividade de efluxo, em todos os ensaios realizados: na avaliação direta do efluxo (método de “Cartwheel” em placa de agar e fluorometria em tempo real) e avaliação indireta do efluxo (determinação de CMIs na presença e ausência dos IEs). Não só apresentou claramente maior capacidade de acumulação na presença de IEs e de efluxo de EtBr, como era o

mais suscetível à redução das CMI dos antibióticos a que se tornou resistente, por parte de todos os IEs em estudo.

O terceiro isolado, AB-3, embora tenha demonstrado atividade de efluxo superior à do isolado AB-1, esta é, de um modo geral, inferior à apresentada pelo isolado AB-2. Assim, estas evidências apontam no sentido do isolado AB-2 ter desenvolvido uma atividade de efluxo significativamente superior à apresentada pelo isolado AB-1, numa fase inicial de resposta à introdução da colistina no esquema terapêutico, permitindo que, ao longo das várias gerações, ocorressem outros mecanismos de resistência, como mutações específicas que conferem resistência à colistina. Após a aquisição de outros mecanismos alternativos que permitem a sobrevivência celular na presença de concentrações elevadas de colistina, torna-se desnecessário o gasto energético sofrido pelas células que suporta a atividade aumentada de efluxo. Possivelmente, o tratamento do doente com concentrações sub-terapêuticas deste antibiótico contribuiu para o aumento da atividade dos sistemas de efluxo. Estes transportadores protegeram a célula bacteriana através do efluxo ativo deste e dos restantes antibióticos, impedindo-os de atingir os seus alvos intracelulares, enquanto ocorria a replicação celular de várias linhagens bacterianas (83,84). É neste ponto que encontramos o isolado AB-3, que apresenta multirresistência aos antibióticos a par de alguma atividade de efluxo, e, possivelmente, outros mecanismos de resistência, como mutações estabilizadas no genoma, entretanto desenvolvidos.

Esta nova hipótese que se levanta a partir das conclusões obtidas neste trabalho será futuramente explorada, através da caracterização genotípica e comparativa dos três isolados sequenciais, da análise comparativa do genoma completo (133) e por análise comparativa da sua transcriptómica (134). Tendo em conta a ordem cronológica em que foram obtidos os isolamentos clínicos, a partir do mesmo doente, é possível afirmar que o modelo de adaptação fenotípica gradual por sobreexpressão de bombas de efluxo, até à aquisição de mutações para a resistência, designado de “arrow of time”, pode ter ocorrido neste caso em estudo, em particular na aquisição de resistência à colistina, fármaco de último recurso (84,135): a atividade dos sistemas de efluxo terá sido o primeiro passo para a aquisição de resistência, nos três isolados clínicos de *A. baumannii* em estudo.

4.3 Inibidores de efluxo como potenciais adjuvantes terapêuticos no tratamento das infecções por *A. baumannii*

Ao longo deste trabalho, foi demonstrado que os sistemas de efluxo são um mecanismo muito importante com um contributo significativo na multirresistência aos antibióticos em isolados clínicos de *A. baumannii*. Assim sendo, as bombas de efluxo podem ser consideradas como potenciais alvos terapêuticos, pela utilização de compostos IEs como adjuvantes na terapêutica das infecções causadas por bactérias resistentes aos antibióticos (73,86,106,135,136). Estas moléculas devem ter a capacidade de aumentar a concentração intracelular dos antibióticos que são substrato de BEs; reverter a suscetibilidade aos antibióticos em isolados clínicos MDR e também prevenir o aparecimento de estirpes mutantes resistentes (86,99,106).

Em bactérias Gram-negativas, foram descritos vários IEs com capacidade de reverter o fenótipo de resistência, embora os seus mecanismos de ação ainda não estejam bem esclarecidos (20,77,86,100). Alguns mecanismos de ação propostos, ainda não totalmente esclarecidos, são a interação direta com a BE, bloqueando-a; a interferência com a fonte energética das BE por inibição da ligação de ATP ou interferindo com o gradiente protónico e a intercalação na bicamada lipídica, destabilizando a membrana plasmática (20,89,99,110). Outros mecanismos propostos contam ainda com a formação de complexos com o substrato, facilitando a entrada dos antibióticos na célula e prevenindo o seu efluxo (106). No entanto, os efeitos secundários tóxicos para o hospedeiro que os compostos IEs apresentam, constituem um entrave para a sua aplicação na prática clínica em humanos e animais (89,99). Contudo, em doses seguras e toleradas, estes compostos podem ser usados em humanos, carecendo ainda de estudos clínicos para avaliar o seu efeito quando administrados em conjunto com os antibióticos (137). Um exemplo são as fenotiazinas, por exemplo, que são atualmente utilizadas na terapêutica clínica como anti-psicóticos (99) ou o verapamil, como antiarrítmico (138).

O interesse geral no desenvolvimento de compostos IEs para uso terapêutico é dificultado pela existência de problemas na sua síntese, purificação, estabilidade e solubilidade, para além da sua potencial toxicidade, já referida (87,99). Apesar disso,

existem já inúmeros estudos *in vitro* sobre a influência destes inibidores em bactérias, incluindo *A. baumannii* (20,77,89,99–102,108,110,123,136,138). Entre outros fatores, é também necessário desenvolver IEs com seletividade para os sistemas de efluxo da célula bacteriana e que não tenham influência nas células do hospedeiro, como é o caso do CCCP, que é um composto extremamente tóxico para as células eucariotas (86).

Como referido anteriormente, os IEs estudados neste trabalho comprovaram ser eficazes na redução das CMIs dos antibióticos: o NMP e CCCP foram os mais eficazes na redução das CMIs em combinação com os antibióticos, possivelmente devido à morte celular; enquanto que os IEs mais eficazes na promoção da acumulação intracelular do EtBr foram o VP, as fenotiazinas (TZ e CPZ) e o PAβN. Apesar das já referidas limitações técnicas e humanas, que constituem um entrave na implementação dos IEs como adjuvantes terapêuticos, no futuro, a sua administração em combinação com antibióticos, poderá significar não só um melhor prognóstico, como a redução da morbilidade e mortalidade associadas às infeções nosocomiais por isolados M/XDR de *A. baumannii*. Até à data, nenhum inibidor de bombas de efluxo foi aprovado para uso terapêutico combinado com antibióticos, no tratamento de infeções bacterianas resistentes aos antibióticos, na prática clínica humana e veterinária, com exceção do omeprazol, um inibidor de bombas de efluxo protónicas gástricas, licenciado apenas para controlo da acidez estomacal/intestinal, tendo indiretamente demonstrado ser um bom adjuvante no tratamento de infeções por *Helicobacter pylori* (139).

O desenvolvimento de outros IEs eficazes e seguros permitirá a utilização de antibióticos que são substrato de BEs assim como o controlo da emergência e disseminação de isolados clínicos MDR de muitos grupos de bactérias, mas em particular em bactérias Gram-negativas com elevada capacidade de efluxo, como é o caso de *A. baumannii* (87,99).

4.4 Trabalho futuro

Ao longo deste trabalho foi confirmada a contribuição do efluxo para a aquisição do fenótipo MDR em isolados clínicos de *A. baumannii*. Através do estudo da capacidade de efluxo nos isolados clínicos em estudo, utilizando as metodologias clássicas como a determinação das CMIs na presença e ausência dos inibidores de efluxo, e a otimização de metodologias diretas para a avaliação do efluxo, como o método de “Cartwheel”, mais grosseiro, e os ensaios de fluorometria em tempo real, confirmámos que a atividade de efluxo nos três isolados de *A. baumannii*, isolados sequencialmente no mesmo doente, levou ao desenvolvimento do fenótipo M/XDR destes isolados.

Para a continuação do estudo dos três isolados clínicos de *A. baumannii* e para uma melhor compreensão da atividade de efluxo nestes isolados e a sua relação com a resistência aos antibióticos, propõe-se, como trabalho futuro:

- Demonstração inequívoca de que os três isolados são idênticos (mesma população) através da caracterização genotípica e comparativa dos três isolados de *A. baumannii*;
- A pesquisa de mutações em genes que conferem resistência aos antibióticos, por análise de sequências do genoma completo dos três isolados de *A. baumannii*;
- Determinar o nível de sobreexpressão das bombas de efluxo nos três isolados, por análise transcriptômica comparativa, tanto na presença como na ausência de cada antibiótico;
- Distinguir entre o contributo proporcionado pela atividade aumentada de efluxo e outros mecanismos de resistência entretanto revelados, como mutações, para o nível global da resistência evidenciada pelos três isolados;
- A determinação das melhores combinações *in vitro* entre antibióticos e IEs, com vista a uma eventual aplicação terapêutica destes compostos como adjuvantes em combinação com os antibióticos na prática clínica, humana e animal.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Peleg AY, Seifert H, Paterson DL.** *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. Clin Microbiol Rev. 2008;21(3):538–82.
2. **Howard A, Donoghue MO, Feeney A, Sleator RD.** *Acinetobacter baumannii*: An emerging opportunistic pathogen. Virulence. 2012;3(3):243–50.
3. **Visca P, Seifert H, Towner KJ.** *Acinetobacter* Infection – an Emerging Threat to Human Health. Life. 2011;63(12):1048–54.
4. **Muller MG, George AR, Walochnik J.** *Acinetobacter baumannii* in Localised Cutaneous Mycobacteriosis in Falcons. Vet Med Int. 2010;1(1):1–7.
5. **Zordan S, Prenger-berninghoff E, Weiss R, Reijden TV, Broek PV, Baljer G.** Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in Veterinary Clinics, Germany. Emerg Infect Dis. 2011;17(9):1751–4.
6. **Rammohan A, Cherukuri S, Sathyanesan E, Palaniappan R.** *Acinetobacter*: A War Zone in the Hospital. Br Microbiol Res J. 2015;10(5):1–11.
7. **Abbott I, Peleg A.** *Acinetobacter baumannii* and hospital infections. Microbiol Aust. 2014;1(15):1–3.
8. **Antunes CS, Visca P, Towner KJ.** *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen. Foodborne Pathog Dis. 2014;1–10.
9. **Richards AM, Abu Kwaik Y, Lamont RJ.** Code blue: *Acinetobacter baumannii*, a nosocomial pathogen with a role in the oral cavity. Mol Oral Microbiol. 2015;30(1):2–15.
10. **Dahiru M, Enabulele OI.** Incidence of *Acinetobacter* in Fresh Carrot (*Daucus carota* subsp. *sativus*). IJNFS. 2015;9(12):1192–5.
11. **Adegoke AA, Okoh AI.** Commensal *Staphylococcus* spp., *Acinetobacter* spp. and *Stenotrophomonas maltophilia* as reservoirs of antibiotic resistance genes. African J Biotechnol. 2012;11(61):12429–35.
12. **Jung J, Park W.** *Acinetobacter* species as model microorganisms in environmental microbiology: current state and perspectives. Appl Microbiol Biotechnol. 2015;99(6):2533–48.
13. **Li G, Yang M, Zhou K, Zhang L, Tian L, Lv S, Jin Y, Qian W, Xiong H, Lin R, Fu Y, Hou X.** Diversity of duodenal and rectal microbiota in biopsy tissues and luminal contents in healthy volunteers. J Microbiol Biotechnol. 2015;25(7):1136–45.

14. **Touchon M, Cury J, Yoon E-J, Krizova L, Cerqueira GC, Murphy C, Feldgarden M, Wortman J, Clermont D, Lambert T, Grillot-Courvalin C, Nemec A, Courvalin P, Rocha EPC.** The Genomic Diversification of the Whole *Acinetobacter* Genus: Origins, Mechanisms, and Consequences. *Genome Biol Evol.* 2014;6(10):2866–82.
15. **Mostachio AK, Levin AS, Rizek C, Rossi F, Zerbini J, Costa SF.** High prevalence of OXA-143 and alteration of outer membrane proteins in carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. isolates in Brazil. *Int J Antimicrob Agents.* 2012;39(5):396–401.
16. **Li P, Yang C, Xie J, Liu N, Wang H, Zhang L, Wang X, Wang Y, Qiu S, Song H.** *Acinetobacter calcoaceticus* from a fatal case of pneumonia harboring bla NDM-1 on a widely distributed plasmid. *BMC Infect Dis.* 2015;15(1):131-139.
17. **Schleicher X, Higgins PG, Wisplinghoff H, Körber-Irrgang B, Kresken M, Seifert H.** Molecular epidemiology of *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter nosocomialis* in Germany over a 5-year period (2005-2009). *Clin Microbiol Infect.* 2013;19(8):737–42.
18. **Fitzpatrick MA, Ozer E, Bolon MK, Hauser AR.** Influence of ACB complex genospecies on clinical outcomes in a U.S. hospital with high rates of multidrug resistance. *J Infect.* 2015;70(2):144–52.
19. **Bergogne-bérézin E, Towner K.** *Acinetobacter* spp. as Nosocomial Pathogens: Microbiological, Clinical, and Epidemiological Features. *Clin Microbiol Rev.* 1996;9(2):148–65.
20. **Xing L, Amoah Barnie P, Su Z, Xu H.** Development of Efflux Pumps and Inhibitors (EPIs) in *A. baumannii*. *Clin Microbiol.* 2014;03(01):1–6.
21. **Molloy MP, Herbert BR, Slade MB, Rabilloud T, Nouwens AS, Williams KL, Gooley AA.** Proteomic analysis of the *Escherichia coli* outer membrane. *Eur J Biochem.* 2000;267(10):2871–81.
22. **Cabeen MT, Jacobs-Wagner C.** Bacterial cell shape. *Nat Rev Microbiol.* 2005;3(8):601–10.
23. **Geisinger E, Isberg RR.** Antibiotic Modulation of Capsular Exopolysaccharide and Virulence in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS Pathog.* 2015;11(2):1–27.
24. **Srinivasan VB, Vaidyanathan V, Rajamohan G.** AbuO, a tolC-like outer membrane protein of *Acinetobacter baumannii*, is involved in antimicrobial and oxidative stress resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(2):1236–45.
25. **Sugawara E, Nikaido H, Ab O, Ab O.** OmpA Is the Principal Nonspecific Slow Porin of *Acinetobacter baumannii*. *J Bacteriol.* 2012;194(15):4089–96.

26. **Rice LB.** Federal Funding for the Study of Antimicrobial Resistance in Nosocomial Pathogens: No ESKAPE. *J Infect Dis.* 2008;197(8):1079–81.
27. **Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, Scheld M, Spellberg B, Barlett J.** Bad Bugs, No Drugs: No ESKAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2009;48(1):1–12.
28. **Al-Dorzi HM, Asiri AM, Shimemri A, Tamim HM, Al Johani SM, Al Dabbagh T, Arabi YM.** Impact of empirical antimicrobial therapy on the outcome of critically ill patients with *Acinetobacter* bacteremia. *Ann Thorac Med.* 2015;10(4):256–62.
29. **Esterly JS, Griffith M, Qi C, Malczynski M, Postelnick MJ, Scheetz MH.** Impact of carbapenem resistance and receipt of active antimicrobial therapy on clinical outcomes of *Acinetobacter baumannii* bloodstream infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(10):4844–9.
30. **Vila J.** Therapeutic options for *Acinetobacter baumannii* infections: an update. *Expert Opin Pharmacother.* 2012;1–18.
31. **Magiorakos A, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hundler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens J, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL.** Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* 2011;18:268–81.
32. **Fishbain J, Peleg AY.** Treatment of *Acinetobacter* Infections. *Clin Infect Dis.* 2010;51(1):79–84.
33. **Michalopoulos A, Falagas ME.** Treatment of *Acinetobacter* infections. *Expert Opin Pharmacother.* 2010;11(5):779–88.
34. **European Centre for Disease Prevention and Control.** Annual epidemiological report 2014 - Antimicrobial resistance & healthcare-associated infections. Stockholm: ECDC; 2015.
35. **Oikonomou O, Sarrou S, Papagiannitsis CC, Georgiadou S, Mantzarlis K, Zakyntinos E.** Rapid dissemination of colistin and carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* in Central Greece: mechanisms of resistance, molecular identification and epidemiological data. *BMC Infect Dis.* 2015;13–8.
36. **Bowers DR, Cao H, Zhou J, Ledesma KR, Sun D, Lomovskaya O, Tam VH.** Assessment of Minocycline and Polymyxin B Combination against *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(5):2720–5.

37. **Moffatt JH, Harper M, Harrison P, Hale JDF, Vinogradov E, Seemann T, Henry R, Crane B, St. Michael F, Cox A, Adler B, Nation RL, Li J, Boyce JD.** Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(12):4971–7.
38. **Snitkin ES, Zelazny AM, Gupta J, Comparative PS, Palmore TN, Murray PR, Segre J.** Genomic insights into the fate of colistin resistance and *Acinetobacter baumannii* during patient treatment. *Genome Res.* 2013;1155–62.
39. **Cai Y, Chai D, Wang R, Liang B, Bai N.** Colistin resistance of *Acinetobacter baumannii*: clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(3):1607–15.
40. **Moffatt JH, Harper M, Adler B, Nation RL, Li J, Boyce JD.** Insertion Sequence IS Aba11 Is Involved in Colistin Resistance and Loss of Lipopolysaccharide in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(6):3022–4.
41. **Li J, Rayner CR, Nation RL, Owen RJ, Spelman D, Tan KE, Liolios L.** Heteroresistance to Colistin in Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(9):2946–9.
42. **Hawley JS, Murray CK, Jorgensen JH.** Colistin Heteroresistance in *Acinetobacter* and Its Association with Previous Colistin Therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(1):351–2.
43. **Falagas ME, Makris GC, Dimopoulos G, Matthaiou DK.** Heteroresistance: a concern of increasing clinical significance? *Clin Microbiol Infect.* 2008;14(2):101–4.
44. **Beceiro A, Llobet E, Bengoechea A, Doumith M, Hornsey M, Dhanji H, Chart H, Bou G, Livermore D, Woodford N.** Phosphoethanolamine Modification of Lipid A in Colistin-Resistant Variants of *Acinetobacter baumannii* Mediated by the pmrAB Two-Component Regulatory System. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(7):3370–9.
45. **El-halfawy OM, Valvano A.** Antimicrobial Heteroresistance: an Emerging Field in Need of Clarity. *Clin Microbiol Rev.* 2015;28(1):191–207.
46. **Kassamali Z, Jain R, Danziger LH.** An Update on the arsenal for multidrug-resistant *Acinetobacter* infections: Polymyxin antibiotics. *Int J Infect Dis.* 2015;30:125–32.
47. **Kumar A, Schweizer H.** Bacterial resistance to antibiotics: Active efflux and reduced uptake. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005;57(10):1486–513.

48. **Wieczorek P, Sacha P, Hauschild T, Zórwaski M, Krawczyk M, Tryniszewska E.** Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* – the role of AdeABC (RND family) efflux pump in resistance to antibiotics. *Folia Histochem Cytobiol.* 2008;46(3):257–67.
49. **Vila J, Pachón J.** Therapeutic options for *Acinetobacter baumannii*. *Expert Opin Pharmacother.* 2008;9(4):587–600.
50. **Livermore DM.** Fourteen years in resistance. *Int J Antimicrob Agents.* 2012;39(4):283–94.
51. **Bbosa GS, Mwebaza N, Odda J, Kyegombe DB, Ntale M.** Antibiotics/antibacterial drug use, their marketing and promotion during the post-antibiotic golden age and their role in emergence of bacterial resistance. *Health (Irvine Calif).* 2014;6(5):410–25.
52. **Poole K.** Resistance to β -lactam antibiotics. *Cell Mol Life Sci.* 2004;61:2200–23.
53. **Cho YJ, Moon DC, Jin JS, Choi CH, Lee YC, Lee JC.** Genetic basis of resistance to aminoglycosides in *Acinetobacter* spp. and spread of *armA* in *Acinetobacter baumannii* sequence group 1 in Korean hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2009;64(2):185–90.
54. **Hooper DC.** Mode of Action of Fluoroquinolones. *Drugs.* 1999;6–10.
55. **Jacoby GA.** Mechanisms of Resistance to Quinolones. *Clin Infect Dis.* 2005;41(2):120–6.
56. **Redgrave LS, Sutton SB, Webber MA, Piddock LJ.** Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends Microbiol.* 2014;22(8):438–45.
57. **Falagas ME, Vardakas KZ, Roussos NS.** Trimethoprim/sulfamethoxazole for *Acinetobacter* spp.: a review of current microbiological and clinical evidence. *Int J Antimicrob Agents.* 2015;46(3):231–41.
58. **Tenover FC.** Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *Am J Med.* 2006;119(6):3–10.
59. **Livermore DM.** Current Epidemiology and Growing Resistance of Gram-Negative Pathogens. *Korean J Intern Med.* 2012;27(2):128–42.
60. **Vila J, Marti S, Sa J.** Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother.* 2007;59(2):1210–5.
61. **Coyne S, Courvalin P, Périchon B.** Efflux-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(3):947–53.
62. **Poirel L, Nordmann P.** Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Eur Soc Clin Infect Dis.* 2006;12(9):826–36.

63. **Rajamohan G, Srinivasan VB, Gebreyes WA.** Molecular and functional characterization of a novel efflux pump, AmvA, mediating antimicrobial and disinfectant resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother.* 2010;6:1919–25.
64. **Nie L, Lv Y, Yuan M, Hu X, Nie T.** Genetic basis of high level aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* from Beijing, China. *Acta Pharm Sin B.* 2014;4(4):295–300.
65. **Potron A, Poirel L, Nordmann P.** Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and epidemiology. *Int J Antimicrob Agents.* 2015;45(6):568–85.
66. **Goldstein BP.** Resistance to rifampicin: a review. *J Antibiot (Tokyo).* 2014;67(9):625–30.
67. **Giannouli M, Popolo AD, Durante-Mangoni E, Bernardo M, Cuccurullo S, Amato G, Tripodi MF, Triassi M, Utili R, Zarrilli R.** Molecular epidemiology and mechanisms of rifampicin resistance in *Acinetobacter baumannii* isolates from Italy. *Int J Antimicrob Agents.* 2012;39(1):58–63.
68. **García-Quintanilla M, Carretero-Ledesma M, Moreno-Martínez P, Martín-Peña R, Pachón J, McConnell MJ.** Lipopolysaccharide loss produces partial colistin dependence and collateral sensitivity to azithromycin, rifampicin and vancomycin in *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents.* 2015;46(6):696–702.
69. **Hood MI, Becker KW, Roux CM, Dunman PM, Skaar P.** Genetic Determinants of Intrinsic Colistin Tolerance in *Acinetobacter baumannii*. *Infect Immun.* 2013;81(2):542–51.
70. **Adams MD, Nickel GC, Bajaksouzian S, Lavender H, Murthy AR, Jacobs MR, et al.** Resistance to Colistin in *Acinetobacter baumannii* Associated with Mutations in the PmrAB Two-Component System. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(9):3628–34.
71. **Olaitan AO, Morand S, Rolain J-M.** Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front Microbiol.* 2014;5(11):643.
72. **Vila-Farrés X, Ferrer-Navarro M, Callarisa AE, Martí S, Espinal P, Gupta S, Rolain JM, Giralt E, Vila J.** Loss of LPS is involved in the virulence and resistance to colistin of colistin-resistant *Acinetobacter nosocomialis* mutants selected in vitro. *J Antimicrob Chemother.* 2015;70(11):2981–6.
73. **Costa S, Junqueira E, Palma C, Viveiros M, Melo-Cristino J, Amaral L, Couto I.** Resistance to Antimicrobials Mediated by Efflux Pumps in *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics.* 2013;2(1):83–99.

74. **Lin MF, Lin YY, Lan CY.** The role of the two-component system BaeSR in disposing chemicals through regulating transporter systems in *Acinetobacter baumannii*. PLoS One. 2015;10(7):1–15.
75. **Martins M, Mccusker MP, Viveiros M, Couto I, Pagès J, Amaral L.** A Simple Method for Assessment of MDR Bacteria for Over-Expressed Efflux Pumps. Open Microbiol J. 2013;7:1–5.
76. **Bohnert JA, Kern W.** Selected arylpiperazines are capable of reversing multidrug resistance in *Escherichia coli* overexpressing RND efflux pumps. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49(2):849–52.
77. **Pannek S, Higgins PG, Steinke P, Jonas D, Akova M, Bohnert JA, Seifert H, Kern W.** Multidrug efflux inhibition in *Acinetobacter baumannii*: comparison between 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine and phenyl-arginine-beta-naphthylamide. J Antimicrob Chemother. 2006;57(5):970–4.
78. **Yoon E, Courvalin P, Grillot-courvalin C.** RND-Type Efflux Pumps in Multidrug-Resistant Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*: Major Role for AdeABC Overexpression and AdeRS Mutations. Antimicrob Agents Chemother. 2013;57(7):2989–95.
79. **Blair JMA, Smith HE, Ricci V, Lawler AJ, Thompson LJ, Piddock LJ.** Expression of homologous RND efflux pump genes is dependent upon AcrB expression: Implications for efflux and virulence inhibitor design. J Antimicrob Chemother. 2015;70(2):424–31.
80. **Lin M-F, Lin Y-Y, Tu C-C, Lan C-Y.** Distribution of different efflux pump genes in clinical isolates of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* and their correlation with antimicrobial resistance. J Microbiol Immunol Infect. 2015;1–8.
81. **Li H, Wang X, Zhang Y, Zhao C, Hongbin C, Jiang S, Zhang F, Wang H.** The role of RND efflux pump and global regulators in tigecycline resistance in clinical *Acinetobacter baumannii* isolates. Future Microbiol. 2015;10(3):337–46.
82. **Piddock LJ.** Clinically Relevant Chromosomally Encoded Multidrug Resistance Efflux Pumps in Bacteria Clinically Relevant Chromosomally Encoded Multidrug Resistance Efflux Pumps in Bacteria. Clin Infect Dis. 2006;19(2):382–402.
83. **Schmalstieg AM, Srivastava S, Belkaya S, Deshpande D, Meek C, Leff R, van Oers NSC, Gumbo T.** The antibiotic resistance arrow of time: Efflux pump induction is a general first step in the evolution of mycobacterial drug resistance. Antimicrob Agents Chemother. 2012;56(9):4806–15.
84. **Gumbo T.** Biological variability and the emergence of multidrug-resistant tuberculosis. Nat Genet. 2013;45(7):720–1.

85. **Laudy AE, Mrowka A, Krajewska J, Tyski S.** The Influence of Efflux Pump Inhibitors on the Activity of Non-Antibiotic NSAIDS against Gram-Negative Rods. *PLoS One*. 2016;11(1):e0147131.
86. **Bambecke F, Pagès J, Lee VJ.** Inhibitors of Bacterial Efflux Pumps as Adjuvants in Antibacterial Therapy and Diagnostic Tools for Detection of Resistance by Efflux. *Front Anti-infective Drug Discov*. 2010;1:138–75.
87. **Anes J, McCusker MP, Fanning S, Martins M.** The ins and outs of RND efflux pumps in *Escherichia coli*. *Front Microbiol*. 2015;6(587):1–14.
88. **Krishnamoorthy S, Shah BP, Lee HH, Martinez LR.** Microbicides Alter the Expression and Function of RND-Type Efflux Pump AdeABC in Biofilm-Associated Cells of *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(1):57–63.
89. **Askoura M, Mottawea W, Abujamel T, Taher I.** Efflux pump inhibitors (EPIs) as new antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa*. *Libyan J Med*. 2011;6(5870):1–8.
90. **Li X, Nikaido H.** Efflux-Mediated Drug Resistance in Bacteria: an Update. 2009;69(12):1555–623.
91. **Rumbo C, Gato E, López M, de Alegría CR, Fernández-cuenca F, Martínez-Martínez L, Vila J, Pachón J, Cisneros JM, Rodríguez-Báño J, Pascual A, Bou G, Tomás M.** Contribution of Efflux Pumps, Porins and β -lactamases to Multidrug Resistance in Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(11):5247–57.
92. **Yoon E, Chabane YN, Goussard S, Snesrud E, Courvalin P, Dé E, Grillot-Courvalin C.** Contribution of Resistance-Nodulation-Cell Division Efflux Systems to Antibiotic Resistance and Biofilm Formation in *Acinetobacter baumannii*. *MBio*. 2015;6(2):1–13.
93. **Roca I, Espinal P, Martí S, Vila J.** First Identification and Characterization of an AdeABC-Like Efflux Pump in *Acinetobacter* Genomespecies 13TU. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(3):1285–6.
94. **Rajamohan G, Srinivasan VB, Gebreyes WA.** Novel role of *Acinetobacter baumannii* RND efflux transporters in mediating decreased susceptibility to biocides. *J Antimicrob Chemother*. 2010;65(12):228–32.
95. **Damier-Piolle L, Magnet S, Bre S, Lambert T, Courvalin P.** AdeIJK, a Resistance-Nodulation-Cell Division Pump Effluxing Multiple Antibiotics in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(2):557–62.

96. **Rajamohan G, Srinivasan VB, Gebreyes WA.** Molecular and functional characterization of a novel efflux pump, AmvA, mediating antimicrobial and disinfectant resistance in *Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob Chemother. 2010;65:1919–25.
97. **Castanheira M, Mendes RE, Jones RN.** Update on *Acinetobacter* Species: Mechanisms of Antimicrobial Resistance and Contemporary In Vitro Activity of Minocycline and Other Treatment Options. Clin Infect Dis. 2014;59(6):367–73.
98. **Pagès J, Amaral L.** Mechanisms of drug efflux and strategies to combat them: Challenging the efflux pump of Gram-negative bacteria. BBA - Proteins Proteomics. 2009;1794(5):826–33.
99. **Mahamoud A, Chevalier J, Alibert-franco S, Kern W V, Pagès J.** Antibiotic efflux pumps in Gram-negative bacteria: the inhibitor response strategy. J Antimicrob Chemother. 2007;59(1):1223–9.
100. **Lamers RP, Cavallari JF, Burrows LL.** The Efflux Inhibitor Phenylalanine-Arginine Beta-Naphthylamide (PAβN) Permeabilizes the Outer Membrane of Gram-Negative Bacteria. PLoS One. 2013;8(3):e60666.
101. **Cortez-Cordova J, Kumar A.** Activity of the efflux pump inhibitor phenylalanine-arginine β naphthylamide against the AdeFGH pump of *Acinetobacter baumannii*. Int J Antimicrob Agents. 2011;37(5):420–4.
102. **Martins M, Dastidar SG, Fanning S, Kristiansen JE, Molnar J, Pàges JM, Schelz Z, Spengler G, Viveiros M, Amaral L.** Potential role of non-antibiotics (helper compounds) in the treatment of multidrug-resistant Gram-negative infections: mechanisms for their direct and indirect activities. J Antimicrob Agents. 2008;31:198–208.
103. **Coelho T, Machado D, Couto I, Maschmann R, Ramos D, von Groll A, Rossetti ML, Silva PA, Viveiros M.** Enhancement of antibiotic activity by efflux inhibitors against multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Brazil. Front Microbiol. 2015;6(330):1–12.
104. **Kowalski P, Jaskowska J, Bojarski AJ, Duszinska B.** The Synthesis of Cyclic and Acyclic Long-chain Arylpiperazine Derivatives of Salicylamide as Serotonin Receptor Ligands. J Heterocycl Chem. 2008;45(1):209–14.
105. **Kern W V, Steinke P, Schumacher A, Schuster S, Bohnert A.** Effect of 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine, a novel putative efflux pump inhibitor, on antimicrobial drug susceptibility in clinical isolates of *Escherichia coli*. J Antimicrob Chemother. 2006;37:339–43.
106. **Marquez B.** Bacterial efflux systems and efflux pumps inhibitors. Biochimie. 2005;87:1137–47.

107. **Amaral L, Viveiros M, Molnar J.** Antimicrobial Activity of Phenothiazines. In Vivo. 2004;18:725–31.
108. **Amaral L, Martins A, Molnar J, Kristiansen JE, Martins M, Viveiros M, Rodrigues L, Spengler G, Couto I, Ramos J, Dastidar S, Fanning S, McCusker M, Pàges J.** Phenothiazines, bacterial efflux pumps and targeting the macrophage for enhanced killing of intracellular XDRTB. In Vivo. 2010;24(4):409–24.
109. **Khan SZ, Longland CL, Michelangeli F.** The Effects of Phenothiazines and Other Calmodulin Antagonists on the Sarcoplasmic and Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} Pumps. Biochem Pharmacol. 2000;60:1797–806.
110. **Amaral L.** Thioridazine: A Therapeutic Panacea for Efflux Pump Mediated Multidrug Bacterial Infections. J Biomol Res Ther. 2015;4(1):1–3.
111. **Martins M, Viveiros M, Couto I, Costa S, Pacheco T, Fanning S, Pàges JM, Amaral L.** Identification of Efflux Pump-mediated Multidrug-resistant Bacteria by the Ethidium Bromide-agar Cartwheel Method. In Vivo. 2011;178:171–8.
112. **Richmond GE, Chua KL, Piddock LJ.** Efflux in *Acinetobacter baumannii* can be determined by measuring accumulation of H33342 (bis-benzamide). J Antimicrob Chemother. 2013;68:1594–600.
113. **Costa S, Falcão C, Viveiros M, Machado D, Martins M, Melo-Cristino J, Amaral L, Couto I.** Exploring the contribution of efflux on the resistance to fluoroquinolones in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. BMC Microbiol. 2011;11(241):1–12.
114. **Paixão L, Rodrigues L, Couto I, Martins M, Fernandes P, de Carvalho C, Monteiro G, Sansonetty F, Amaral L, Viveiros M.** Fluorometric determination of ethidium bromide efflux kinetics in *Escherichia coli*. J Biol Eng. 2009;3:18.
115. **Viveiros M, Martins A, Paixão L, Rodrigues L, Martins M, Couto I, Fahnrich E, Kern W, Amaral L.** Demonstration of intrinsic efflux activity of *Escherichia coli* K-12 AG100 by an automated ethidium bromide method. Int J Antimicrob Agents. 2008;31(5):458–62.
116. **Martins A, Hunyadi A, Amaral L.** Mechanisms of Resistance in Bacteria: An Evolutionary Approach. Open Microbiol J. 2013;7(1-M4):53–8.
117. **Gröblacher B, Kunert O, Bucar F.** Compounds of *Alpinia katsumadai* as potential efflux inhibitors in *Mycobacterium smegmatis*. Bioorganic Med Chem. 2012;20(8):2701–6.
118. **Colquhoun JM, Wozniak RAF, Dunman PM.** Clinically Relevant Growth Conditions Alter *Acinetobacter baumannii* Antibiotic Susceptibility and Promote Identification of Novel Antibacterial Agents. PLoS One. 2015;10(11):e0143033.

119. **Ng TM, Teng CB, Lye DC, Apisarnthanarak A.** A multicenter Case-Control Study for Risk Factors and Outcomes of Extensively Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Bacteremia. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2015;35(01):49–45.
120. **Falagas ME, Vardakas KZ, Kapaskelis A, Triarides NA, Roussos NS.** Tetracyclines for multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *Int J Antimicrob Agents.* 2015;45(5):455–60.
121. **Pachón-Ibáñez ME, Smani Y, Pachón J.** Use of adjuvants in the treatment of *Acinetobacter baumannii*. *Anti Infect Ther.* 2016;14(2):153–5.
122. **Gholami M, Hashemi A, Hakemi-Vala M, Goudarzi H, Hallajzadeh M.** Efflux pump inhibitor phenylalanine-arginine B-naphthylamide effect on the minimum inhibitory concentration of imipenem in *Acinetobacter baumannii* strains isolated from hospitalized patients in Shahid Motahari Burn Hospital, Tehran, Iran. *Jundishapur J Microbiol.* 2015;8(10).
123. **Yang Y, Chua KL.** Assessment of the effect of efflux pump inhibitors on in vitro antimicrobial susceptibility of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents.* 2013;42(3):283–4.
124. **Bouvet PJM, Grimont PD.** Taxonomy of the Genus *Acinetobacter* with the Recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov. and Emended Descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus*. *Int J Syst Bacteriol.* 1986;36(2):228–40.
125. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard — Ninth Edition. CLSI document M07-A9. 2012. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
126. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eleventh Edition. CLSI document M02-A11. 2012. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
127. **The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing.** Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 4.0, 2014. Acedido em <http://www.eucast.org>. a 25 Setembro de 2015.
128. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement. CLSI document M100-S23. 2014. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

129. **Direção Geral da Saúde.** Norma 004/2013. Alínea a) do nº2 do Artigo 2º do Decreto Regulamentar nº 14/2012, de 26 de Janeiro.
130. **Machado L, Spengler G, Evaristo M, Handzlik J, Molnár J, Viveiros M, Kiec-Kononowicz K, Amaral L.** Biological Activity of Twenty-three Hydantoin Derivatives on Intrinsic Efflux Pump System of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis NCTC 13349. In Vivo. 2011;25:769–72.
131. **Viehman JA, Nguyen MH, Doi Y.** Treatment options for carbapenem-resistant and extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. Drugs. 2014;74(12):1315–33.
132. **Sun J, Deng Z, Yan A.** Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. Biochem Biophys Res Commun. 2014;453(2):254–67.
133. **Li H, Liu F, Zhang Y, Wang X, Zhao C, Chen H, Zhang F, Zhu B, Hu Y, Wang H.** Evolution of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* revealed through whole-genome sequencing and comparative genomic analysis. Antimicrob Agents Chemother. 2015;59(2):1168–76.
134. **Hassan K, Elbourne L, Li L, Gamage H, Liu Q, Jackson S, Sharples D, Kolsto A, Henderson P, Paulsen I.** An ace up their sleeve: A transcriptomic approach exposes the AceI efflux protein of *Acinetobacter baumannii* and reveals the drug efflux potential hidden in many microbial pathogens. Front Microbiol. 2015;6:1–6.
135. **Machado D, Couto I, Perdigão J, Rodrigues L, Portugal I, Baptista P, Veigas B, Amaral L, Viveiros M.** Contribution of efflux to the emergence of isoniazid and multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. PLoS One. 2012;7(4).
136. **Viveiros M, Martins M, Rodrigues L, Machado D, Couto I, Ainsa J, Amaral L.** Inhibitors of mycobacterial efflux pumps as potential boosters for anti-tubercular drugs. Anti Infect Ther. 2012;10(9):983–98.
137. **Sonnet P, Izard D, Mullié C.** Prevalence of efflux-mediated ciprofloxacin and levofloxacin resistance in recent clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and its reversal by the efflux pump inhibitors 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine and phenylalanine-arginine- β -naphthylamide. Int J Antimicrob Agents. 2012;39(1):77–80.
138. **Gupta S, Tyagi S, Almeida D V., Maiga MC, Ammerman NC, Bishai WR.** Acceleration of tuberculosis treatment by adjunctive therapy with verapamil as an efflux inhibitor. Am J Respir Crit Care Med. 2013;188(5):600–7.
139. **Zeng Y, Ye Y, Liang D, Guo C, Li L.** Meta-analysis of the efficacy of lansoprazole and omeprazole for the treatment of *H. pylori*-associated duodenal ulcer. Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol. 2015;7(3):158–64.

140. **Poole K.** Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. Clin Microbiol Infect. 2004;10(1):12–26.